

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Letícia Márcia da Silva Tinoco

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÁCIDO RETINOICO
FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO COMO ALTERNATIVA
PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

Diamantina-MG
2016

Letícia Márcia da Silva Tinoco

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÁCIDO RETINOICO
FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO COMO ALTERNATIVA
PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Carneiro

Coorientadora: Prof. Dra. Elaine Amaral Leite

**Diamantina –MG
2016**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

T591d

Tinoco, Leticia Márcia da Silva

Desenvolvimento de nanoemulsões contendo ácido retinoico funcionalizadas com ácido hialurônico como alternativa para o tratamento de câncer / Leticia Márcia da Silva Tinoco. – Diamantina, 2016.

112 p. : il.

Orientador: Guilherme Carneiro

Coorientador: Elaine Amaral Leite

Dissertação (Mestrado Profissional – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Ácido retinoico. 2. Ácido hialurônico. 3. Câncer.
4. Direcionamento ativo. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 615

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Letícia Márcia da Silva Tinoco

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÁCIDO RETINOICO
FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO COMO ALTERNATIVA
PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Carneiro

Data de aprovação ____/____/____

Prof. Dr. João Paulo Mesquita
Departamento de Química–UFVJM

Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly
Departamento de Química –UFVJM

Diamantina-MG
2016

Este trabalho contou com a colaboração de:

Professora Dra. Andréa Renata Malagutti

Departamento de Farmácia

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM

Professor Dr. Juan Pedro Bretas Roa

Departamento Ciência e Tecnologia

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM

Professor Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira

Departamento de Produtos Farmacêuticos

Faculdade de Farmácia, UFMG

AGRADECIMENTOS

Deus – Gostaria de agradecer a Deus por me acompanhar em cada passo, me concedendo sabedoria, força e determinação para seguir em frente.

Guilherme – Gostaria de agradecer ao meu orientador Guilherme pela oportunidade e confiança para desenvolver este trabalho. Obrigada pelos ensinamentos tanto pessoais quanto profissionais que me proporcionaram um crescimento e amadurecimento como pessoa. Obrigada pela paciência, carinho e compreensão ao longo desses anos e principalmente devo agradecer pela sua amizade, você sempre será minha referência como mestre.

Elaine – Obrigada pela oportunidade de ter desenvolvido este trabalho sob a sua co-orientação e pelos ensinamentos ao longo desses anos.

Juan – Obrigada pela colaboração e ensinamentos para desenvolver este trabalho.

Álvaro – Obrigada pelas brincadeiras que descontraía o meu dia e pela gentileza de disponibilizar o laboratório quando eu precisava.

Família – Obrigada aos meus pais, Maria e Carlos, pelo apoio e incentivo ao longo desses anos. Gostaria de agradecer ao meu irmão Carlos Fasane e sua esposa Sylvia por todo apoio e ensinamentos ao longo desses anos.

Paulo César – Obrigada pelo apoio, incentivo, carinho, compreensão nos momentos de ausência e companheirismo demonstrados ao longo desses dois anos. Agradeço por ouvir minhas preocupações e torcer por esta conquista. Palavras de agradecimento são poucas diante da enorme contribuição que você teve neste trabalho. Agradeço a Deus por ter colocado uma pessoa tão especial em meu caminho, sempre com um sorriso no rosto e disposto a me ajudar.

Márcia – obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e por se uma pessoa tão presente na minha vida.

Joubert – obrigada por me ensinar o verdadeiro significado da palavra amigo, e me fazer descobrir que eu não estava sozinha, que apesar da distância você se fez presente em cada

momento dessa trajetória. Não tenho nem palavras para agradecer o carinho que você sempre demonstra por mim.

Laboratório – Gostaria de agradecer a Flávia, Flor, Irma e Karen pelos momentos que passamos juntas no laboratório. Em especial a Flávia, por ter feito parte desse trabalho e contribuído muito. Sara, gostaria de te agradecer por todos os momentos que passamos juntas nesses dois anos no laboratório, e principalmente pela amizade.

Isabela e Dalila – Gostaria de agradecer s Isabela e Dalila pelos momentos que passamos juntas e por ter passados por muitos momentos divertidos juntas.

Lays – Obrigada pela sua amizade, pelos momentos que passamos juntas e pelo apoio.

Kelly e Letícia – Gostaria de agradecer a vocês pelos momentos que passamos juntas no laboratório de parasito. Leticia, obrigada pelos conversas e apoio nos momentos difíceis. Kelly, agradeço também por ter me acolhido nos momentos que eu mais precisei.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para elaboração deste trabalho.

RESUMO

O ácido retinoico (AR), um derivado da vitamina A, é um dos exemplos mais bem-sucedidos de fármacos usados na terapia de diferenciação do câncer. O AR é um fármaco altamente lipofílico (log P 4,6) que apresenta baixa solubilidade aquosa, limitando sua utilização parenteral. Dessa forma, sua incorporação em nanocarreadores lipídicos tem sido proposta como uma alternativa promissora para a administração desse fármaco. O maior direcionamento dos nanossistemas para as células tumorais pode ser obtido por meio de modificações na superfície deste, como o revestimento com ácido hialurônico (AH), que se liga a receptor CD44 sobre-expresso em alguns tumores. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo principal desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antineoplásica *in vitro* de nanoemulsões contendo AR revestidas e não revestidas com AH para tratamento de câncer de mama. Primeiramente, foi desenvolvido um método espectrofotométrico, com detecção do AR em 324 nm, que foi validado em relação à seletividade em relação aos componentes de matriz e aos produtos de degradação forçada, linearidade, precisão, exatidão e robustez, conforme a legislação pertinente. Em seguida, foram desenvolvidas e caracterizadas nanoemulsões (NE) preparadas por emulsificação espontânea e revestidas eletrostaticamente com AH em diferentes concentrações. Após o revestimento com 0,5 mg/mL de AH, a NE escolhida apresentou tamanho de 158 ± 5 nm, distribuição monodispersa e potencial zeta de $-19,7 \pm 1,20$ mV e um teor de encapsulação de $99,2 \pm 0,5\%$, estando compatível com a administração parenteral. Além disso, as formulações revestidas permaneceram estáveis ao longo de 60 dias armazenadas a 4°C. O perfil de liberação do AR a partir dos nanossistemas foi avaliado e observou-se que segue uma cinética de primeira ordem, de forma que a taxa de liberação depende da concentração do fármaco ainda presente na matriz. Foram, por fim, avaliados os efeitos citotóxicos em linhagens de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e fibroblastos normais (L929) e observou-se que a formulação revestida promove aumento de atividade anticâncer do AR, especialmente nas células que expressam mais os receptores CD44 (MDA-MB-231) e reduzida toxicidade em relação às células normais. Desta forma, a encapsulação do AR em NE revestida por AH pode ser uma abordagem interessante para aumentar a eficácia e a biodisponibilidade do AR no tratamento do câncer de mama e outros tipos de câncer que sobre-expressam esse receptor.

Palavras-chave: Ácido retinoico. Ácido hialurônico. Câncer. Direcionamento ativo. Nanoemulsão.

ABSTRACT

Retinoids, such as all-*trans* retinoic acid (RA), are structural molecules derived from vitamin A and play important roles in various cell types, especially on vision, cell proliferation and differentiation. RA is a lipophilic acid (log P 4.6) with low aqueous solubility, which limits its pharmaceutical use. In order to allow its parenteral administration, an interesting alternative could be its incorporation in lipid nanocarrier systems, such as nanoemulsions (NE). On the other hand, it is possible to increase the target to CD44 receptor expressing tumor cells, coating the NE surface with hyaluronic acid (HA). Therefore, the main goal of this study was to develop, characterize and evaluate the *in vitro* antitumor activity of RA-loaded NE coated with HA for the treatment of breast cancer. First, a spectrophotometric method was developed, with RA detection at 324 nm, which was validated with regard to selectivity to matrix components and forced degradation products, linearity, precision, accuracy and robustness, in accordance with the proper legislation. Then, the NE, prepared by the spontaneous emulsification and electrostatically coated with HA in different concentrations, were developed and characterized. After coating with 0.5 mg/mL, the chosen HA-coated NE presented size of 158 ± 5 nm, monodisperse distribution, zeta potential of -19.7 ± 1.20 mV and encapsulating efficiency of $99.2 \pm 0.5\%$, which is compatible with parenteral administration. Moreover, the coated formulations remained stable over 60 days stored at 4 °C. The RA release profile from the nanosystems was evaluated and it follows the first order kinetics, so that the release rate depends on the drug concentration still present in the matrix. Finally, the cytotoxic effects were assessed in breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) and in normal fibroblasts (L929), and found that the coated formulation promotes increased anticancer activity of RA, especially in cells expressing plus CD44 receptors (MDA-MB-231) and reduced toxicity compared to normal cells. Thus, the encapsulation of RA in HA-coated NE can be an interesting approach to increase the RA efficacy and bioavailability in the treatment of breast cancer and other cancers overexpressing that receptor.

Keywords: Retinoic acid. Hyaluronic acid. Cancer. Active targeting. Nanoemulsion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo celular para células em mitose (Adaptado de ALMEIDA et al., 2005).....	28
Figura 2 - Representação diagramática do sistema vascular. (A) Tecido normal. (B) Tumor sólido. Pode-se observar a presença dos vasos sanguíneos mal-formados, fenestrações, ramificações excessivas, dentre outras características (Adaptado de TREDAN <i>et al.</i> , 2007). 30	
Figura 3 – Estrutura química básica dos retinoides, com o destaque para o AR (Adaptado de DAS et al., 2014).	32
Figura 4 – Representação esquemática do direcionamento de nanopartículas para a região tumoral por meio do EPR (Adaptado de Prakash et al., 2011).	35
Figura 5 – Direcionamento ativo de nanocarreadores lipídicos com ligante de superfície (Adaptado de Song <i>et al.</i> , 2014).	36
Figura 6 - Fotografia de uma NE (à esquerda) e uma macroemulsão (à direita) (Solans <i>et al.</i> , 2005).	37
Figura 7 – Procedimento geral para o preparo de NE por emulsificação espontânea (Adaptado de VADAMME & ANTON, 2010).	39
Figura 8 – Estrutura química do ácido hialurônico. (S1) Ácido D-glicurônico. (S2) N-acetilglicosamina (Adaptada de PONNURAJ e JEDRZEJAS, 2000).	40
Figura 9 – Estrutura do receptor CD44 (Adaptado de TOOLE et al., 2002).	41
Figura 10 – Espectro de absorção da solução de AR e de NE-BR no intervalo dos comprimentos de onda de 200 a 400nm. A seta indica a absorbância do AR em 324 nm.	57
Figura 11 – Espectros de absorção do AR antes (A) e após exposição a luz solar por 10 e 30 minutos (B e C, respectivamente). A seta indica a absorbância do AR em 324 nm.	59
Figura 12 – Espectro de absorção para o AR antes (A) e após a exposição à degradação em meio ácido em tempo 0 (B), 1 hora (C), 2 horas (D), 3 horas (E) e 6 horas (F).....	60
Figura 13 – Espectro de absorção para o AR antes (A) e após a exposição à degradação em meio neutro em tempo 0 (B), 1 hora (C), 2 horas (D), 3 horas (E) e 6 horas (F).	61
Figura 14 – Curva analítica consenso construída	64
Figura 15 – Representação esquemática do preparo das NE pelo método de emulsificação espontânea.	75
Figura 16 – Representação esquemática do revestimento das NE por atração eletrostática ...	77
Figura 17 – Esquema da determinação da concentração total do AR.	79
Figura 18 – Esquema da determinação da concentração do AR filtrado	79

Figura 19 –Representação esquemática do estudo de liberação das formulações pelo método de diálise.	81
Figura 20 – Reação de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT, amarelo) a cristais de formazan (azuis) pela redutase mitocondrial de células viáveis (CARNEIRO et al., 2013).	82
Figura 21 – Influência da concentração de AH tanto no diâmetro médio dos glóbulos e IP (A), quanto no potencial zeta (B) das NE-AR.	88
Figura 22 – Teor de encapsulação e microscopia de luz polarizada da NE-AR e NE-AR-AH.	90
Figura 23 – Espectros de infravermelho na faixa de 4000-700 cm ⁻¹	90
Figura 24 – Análise da estabilidade da NE-AR revestida por AH ao longo de 60 dias. (A)Diâmetro médio e índice de polidispersão. (B) Potencial zeta. (C) Teor de encapsulação.	92
Figura 27 – Perfis de liberação do AR, NE-AR e NE-AR-AH ao longo do tempo.	93
Figura 28 – Estudos de viabilidade celular, avaliada por ensaio de MTT, em células MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) e L929 (C) após 48h de tratamento.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo do estudo de degradação do AR.....	52
Tabela 2 – Tomada de amostra para preparo das soluções de AR na construção das curvas analíticas.....	52
Tabela 3 – Testes estatísticos aplicados à regressão linear	53
Tabela 4 – Porcentagem de interferência da NE-BR na determinação do AR (concentração: 3,0 µg/mL).....	58
Tabela 5 - Concentrações de AR e valores de absorbância para a construção das curvas-padrão.	62
Tabela 6 – Análise da regressão linear na construção da curva consenso.....	64
Tabela 7 – Análise de precisão intra-dia e inter-dias.....	65
Tabela 8 – Porcentagens de recuperação de AR na matriz de NE em diferentes níveis de concentração.	66
Tabela 9 – Recuperação de AR em NE-AR, variando marca do solvente e concentração de hidróxido de sódio na proporção dos solventes.....	67
Tabela 10 – Composição das NE (% p/v).....	76
Tabela 11 – Parâmetros de processo otimizados no preparo das NE.	77
Tabela 12 – Caracterização das NE otimizadas quanto a composição.	85
Tabela 13 – Caracterização das NE otimizadas quanto ao procedimento de preparo.	87
Tabela 14 – Coeficientes de determinação referentes à cinética de liberação/dissolução do AR em PBS:etanol:Tween® 80 (88:10:2) determinados após a aplicação dos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, modelo de Higuchi e Korsmeyer-Peppas.....	94
Tabela 15 – Valores de IC50 calculados para as linhagens de células tumorais e normais*..	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A/O – Água em óleo
- AH – Ácido hialurônico
- ANOVA – Análise de variância
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- AR – Ácido retinoico *todo-trans*
- CLN – Carreadores lipídicos nanoestruturados
- Col – Colesterol
- DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*
- BNT – Benetamina
- DOPE – Dioleilfosfatidiletanolamina
- DP – Desviopadrão
- DSPC – Diestearoilfosfatidilcolina
- DSPE-PEG – Distearoilfosfatidiletanolamina-N-poli(etilenoglicol) 2000
- EDL – Espalhamento Dinâmico da Luz
- EHL – Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
- FA – Fase aquosa
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FO – Fase oleosa
- HCl – Ácido clorídrico
- IP – Índice de polidispersão
- log P – log do coeficiente de partição
- MTT – Brometo de 3-(4,3-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
- NaOH – Hidróxido de sódio
- NE – Nanoemulsão
- NE-AR – Nanoemulsão contendo ácido retinoico
- NE-AR-AH – Nanoemulsão contendo ácido retinoico revestida com ácido hialurônico
- NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas
- O/A – Óleo em água
- OMS – Organização Mundial da Saúde

PEG – Polietilenoglicol
RAR – Receptor de ácido retinoico
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
RXR – Receptor de retinoide X
SA – Estearilamina
SFB – Soro fetal bovino
TCL – Triglicerídeos de cadeia longa
TCM – Triglicerídeos de cadeia média
TE – Teor de encapsulação
THF – Tetrahidrofurano
UV/Vis – Ultravioleta/Visível
DP – Desvio padrão
DPR – Desvio padrão relativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 Câncer.....	27
2.1.1 Quimioterapia do câncer.....	30
2.2 Ácido Retinoico.....	31
2.3 Nanocarreadores Lipídicos.....	33
2.3.1 Nanoemulsões.....	36
2.4 Ácido Hialurônico.....	39
2.4.1 Métodos de Revestimento com Ácido Hialurônico.....	41
3 OBJETIVOS	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
CAPITULO 1 - VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA PARA DOSEAMENTO DE ÁCIDO RETINOICO EM NANOEMULSÕES	45
1 INTRODUÇÃO	47
2 MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1 Materiais.....	49
2.1.1 Equipamentos	49
2.2 Desenvolvimento do método analítico.....	49
2.2.1 Preparo das soluções estoque dos fármacos	49
2.2.2 Seleção e otimização das condições espectrofotométricas.....	50
2.3 Validação do método analítico	50
2.3.1.1 Seletividade em relação aos excipientes da formulação	50
2.3.2 Linearidade	51
2.6.3 Precisão.....	53
2.6.4 Robustez	54

2.6.5 Limite de detecção e quantificação	54
2.7 Análises estatísticas	55
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1 Seletividade	57
3.1.1 Seletividade em relação aos excipientes da formulação	57
3.1.2 Estudo de Degradação Forçada	58
3.3 Linearidade	62
3.4 Precisão	64
3.5 Exatidão	65
3.6 Robustez	66
4 CONCLUSÃO PARCIAL	68
CAPITULO 2 - DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÁCIDO RETINOICO REVESTIDAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO.....	70
1 INTRODUÇÃO	72
2 MATERIAIS E MÉTODOS	74
2.1 Materiais.....	74
2.2 Preparação de NE.....	74
2.2.1 Desenvolvimento das nanoemulsão sem revestimento	75
2.2.2 Revestimento das Nanoemulsões com Ácido Hialurônico	77
2.3 Caracterização das nanoemulsões.....	77
2.3.1 Determinação do diâmetro médio dos glóbulos das NE.....	77
2.3.2 Determinação do potencial zeta dos glóbulos das NE	78
2.3.3 Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	78
2.3.4 Determinação do teor de encapsulação do AR	78
2.3.6 Microscopia de Luz Polarizada	80
2.4 Estudo de estabilidade preliminar das NE	80

2.5 Estudos <i>in vitro</i>	80
2.5.1 Avaliação da cinética de liberação	80
2.5.2 Cultivo das linhagens celulares	82
2.5.3 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT)	82
2.5 Análises Estatísticas.....	83
3 RESULTADOSE DISCUSSÃO	85
3.1 Desenvolvimento e caracterização das NE	85
3.3 Estudo preliminar de estabilidade	91
3.4 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	92
3.4.2 Avaliação da viabilidade celular	94
4 CONCLUSÃO PARCIAL	99
5 CONCLUSÃO GERAL.....	97
REFERÊNCIASBIBLIOGRÁFICAS	102

1 INTRODUÇÃO

A vitamina A e seus derivados têm a habilidade de reduzir o crescimento de tumores e de induzir a apoptose e diferenciação em vários tipos de câncer. Em particular, o ácido retinoico todo-trans (AR) tem sido estudado para o tratamento do câncer, incluindo leucemia e câncer de mama. A ação do AR é atribuída à sua ligação aos receptores nucleares: receptor ácido retinoico (RAR) e receptor retinoide X (RXR), que regulam uma variedade de genes. O AR geralmente bloqueia o ciclo celular na fase G₁, causando inibição da proliferação e apoptose (TANG e GUDAS, 2011). O uso clínico mais efetivo do AR para doenças humanas foi demonstrado no tratamento da leucemia promielocítica aguda (NILES, 2004; BUSHUE e WAN, 2010).

O AR é um fármaco altamente lipofílico ($\log P = 4,6$) (ABDULMAJED e HEARD, 2004) que apresenta baixa solubilidade aquosa (0,21 μM) (SZUTS e HASONI, 1991). Em ensaios clínicos, o AR é administrado a pacientes com câncer pela via oral. Entretanto, a biodisponibilidade do AR oral é baixa e bastante variada (ADAMSON et al., 1993). Além disso, o tratamento contínuo com o AR oral é associado com redução progressiva da concentração plasmática, chegando a níveis abaixo dos requeridos para gerar seu efeito, o que tem sido associado à indução do metabolismo dependente do citocromo P450 (MUINDI et al., 1992). Estes fatores limitam o uso clínico do AR oral e uma formulação intravenosa pode contornar este problema. Alguns esforços têm sido feitos no sentido de permitir sua administração por esta via usando nanocarreadores, especialmente os sistemas lipídicos como os lipossomas, as nanoemulsões (NE), as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (LIM et al., 2004; CHANSRI et al., 2006; KAWAKAMI et al., 2006; CARNEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2015).

Os nanossistemas têm a capacidade de se acumular no tumor, após a administração intravenosa devido à arquitetura do tumor, que envolve fenestrações no endotélio e ausência de drenagem linfática eficaz (MAEDA, 2001). No entanto, este efeito, de direcionamento passivo chamado de “efeito de permeabilidade e retenção aumentada” (EPR), não pode garantir a internalização de todos os nanossistemas, de modo que o fármaco pode ser liberado antes dos nanocarreadores serem captados pelas células cancerosas, resultando numa eficácia terapêutica indesejável. Considerando-se que o alvo do AR são os receptores nucleares, a sua entrega intracelular é importante para obter melhor efeito terapêutico.

O ácido hialurônico (AH) tem sido utilizado como agente de revestimento de nanocarreadores com o intuito de promover o direcionamento ativo para tumores devido à sua

capacidade de se ligar especificamente ao receptor CD44 sobreexpresso em alguns tipos de câncer. Como o AH é uma substância endógena, ele tem as vantagens de ser biocompatível, biodegradável e não imunogênico, o que o torna um bom ligante para ser utilizado no revestimento de nanocarreadores (RIVKIN *et al.*, 2010 e SUNet *et al.*, 2012). Desta forma, as principais vantagens de nanocarreadores revestidos com AH são o direcionamento seletivo e o aumento do tempo de permanência na circulação sanguínea, resultante da sua superfície hidrofílica (ALMALIK, KARIMI, *et al.*, 2013; TRAN *et al.*, 2014).

Previamente, foi relatado que a formação de um par iônico entre o AR e diferentes aminas proporciona aumento em sua encapsulação em NLS. Dentre as aminas testadas, a estearilamina (SA), uma amina lipofílica, proporcionou a mais alta encapsulação (CARNEIRO *et al.*, 2012; CASTRO *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2009). Estas investigações prévias se deram no contexto do desenvolvimento e avaliação de formulações para o tratamento do câncer e o tratamento tópico da acne. A grande desvantagem é que, devido à carga positiva da SA, os nanocarreadores formados apresentam elevado potencial zeta e, com isso, uma toxicidade celular inespecífica. Diante disso, a hipótese deste trabalho é que NE carregadas com o par iônico entre AR e SA revestidas com AH por atração eletrostática poderiam ser alternativas interessantes para aumentar a eficácia do AR e reduzir a toxicidade associada à carga positiva no tratamento do câncer. Essa atividade anticâncer *in vitro* foi investigada contra diferentes linhagens celulares de câncer de mama.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

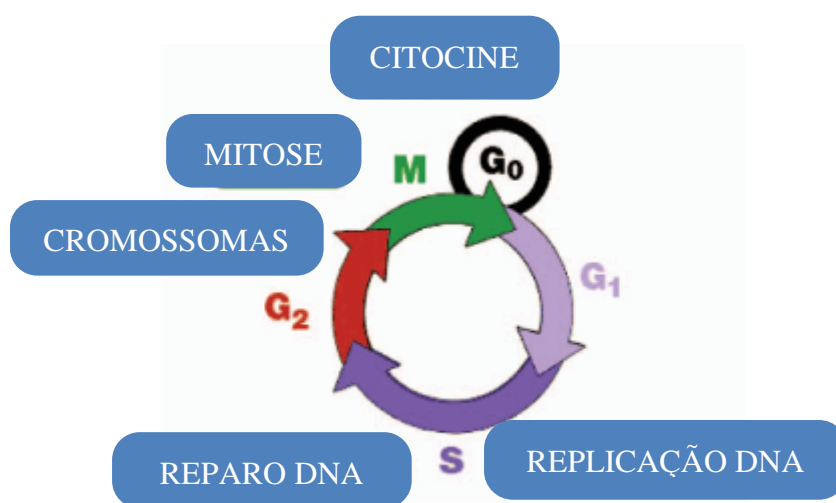
Atualmente, as neoplasias são uma das principais causas de morte no mundo. Em 2015, ocorreram cerca de 476.200 casos de câncer, exceto câncer de pele não melanoma, no Brasil. Além disso, mais de 57.120 casos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. Neste contexto, alguns fatores, tais como aumento da expectativa de vida, a urbanização e a globalização, podem explicar parte dos 596.000 novos casos de câncer estimados no Brasil no ano de 2016. Em 2016, os principais tipos de neoplasias que ocorrerão no Brasil serão, por ordem de incidência, os de pele não melanoma (para ambos os sexos), o de próstata e o de mama. Outros cânceres cuja incidência merece destaque são os do intestino grosso (terceiro mais incidente entre as mulheres e o quarto entre os homens); pulmão (segundo entre os homens e quarto entre as mulheres), colo do útero (terceiro mais comum nas mulheres) e estômago (quarto entre os homens e quinto entre as mulheres) (INCA, 2016).

O câncer de mama é o primeiro câncer mais incidente entre as mulheres brasileiras. Estima-se que a prevalência aumente cerca de 25% a cada ano. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da doença pode-se citar a idade avançada, menarca precoce, menopausa tardia, primeira gestação tardia, obesidade na pós-menopausa, exposição à radiação ionizante em altas doses, exposição a pesticidas ou organoclorados, dieta, consumo de álcool, tabagismo, história de câncer de ovário ou de mama, história de doença mamária benigna, alta densidade mamária, mutações genéticas nos genes BRCA1 e BRCA2, e história familiar de câncer de mama. Além disso, o histórico familiar de câncer de mama aumenta em cerca de 50% a chance do desenvolvimento desta doença em gerações futuras (INCA, 2016).

A multiplicação e diferenciação morfológica e funcional das células são processos essenciais aos seres vivos uma vez que as células se organizam em tecidos para exercerem papéis específicos e vitais. Esses dois processos são regulados por fatores internos e externos, contudo, estão sob o controle de um sistema integrado e complexo que mantém a população celular dentro de limites fisiológicos (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2006). O ciclo celular (Figura 1) é dividido em quatro etapas. A fase G₁ é aquela na qual se observa intensa síntese de RNA e proteínas; nessa etapa, a célula está com o tamanho aumentado e se preparando para a duplicação do material genético, em resposta aos fatores de crescimento e sinais internos. A fase S é a etapa em que ocorre a duplicação do DNA e G₂ é a etapa na qual a célula se prepara

para realizar a mitose. Em seguida, a célula entra na etapa M onde ocorre a mitose celular. Há ainda a etapa G_0 na qual a célula, após deixar a mitose, permanece em estado de repouso por período variado (KENNY *et al.*, 2004; BRASILEIRO-FILHO *et al.*, 2011). No entanto, é com frequência que podem surgir transtornos que afetam o controle dos mecanismos de divisão celular induzindo aos distúrbios de proliferação e diferenciação e consequentemente acarretando o aparecimento do câncer.

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo celular para células em mitose (Adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2005).



As neoplasias são geradas a partir de alterações que podem ocorrer em genes denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando os proto-oncogenes são ativados transformam-se em oncogenes, responsáveis pela transformação das células normais. O crescimento descontrolado de células de um determinado tecido mesmo após cessar o estímulo é denominado neoplasia ou tumor. Os tumores podem ser classificados em malignos e benignos. Os tumores malignos são massas de células anormais que podem se desprender do tumor e migrarem, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos ocorrendo metástase. Já os tumores benignos são novos tecidos que, devido às suas características micro e macroscópicas não tem a capacidade de migrar para tecidos adjacentes, permanecendo no local onde surgiu (ALMEIDA *et al.*, 2005; ROBBINS e COTRAN, 2006). É possível identificar alguns traços que são apresentados pelas células tumorais, independentemente de sua origem, como a autonomia frente à fatores de crescimento, insensibilidade à fatores de inibição, evasão da apoptose ou morte celular programada, capacidade replicativa ilimitada, angiogênese sustentada e capacidade de invasão tecidual e metástase (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000).

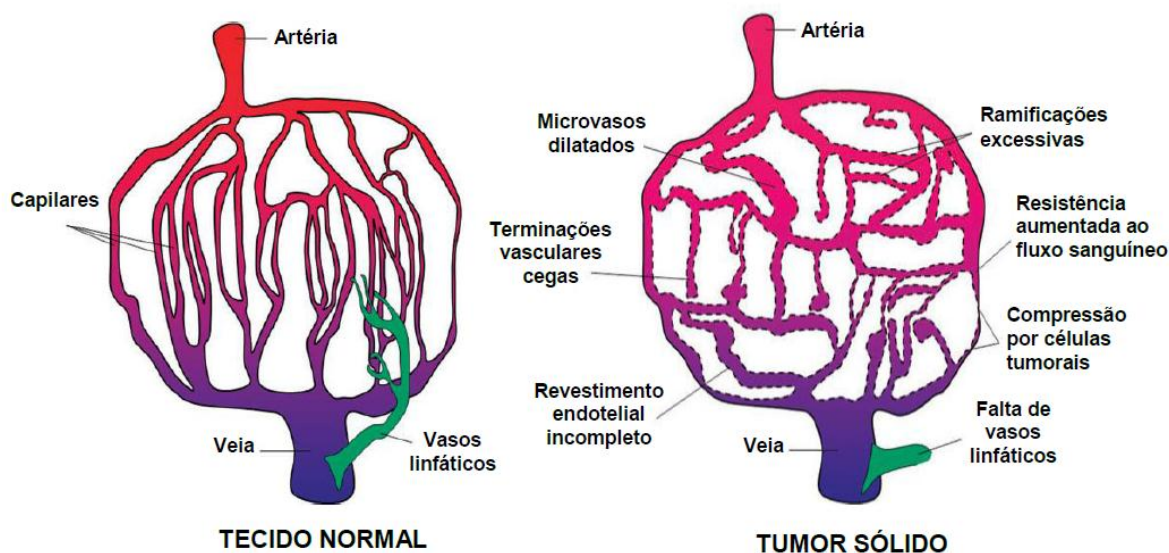
Recentemente uma hipótese interessante sugere que modificações epigenéticas podem acontecer anteriormente aos eventos genéticos acumulados durante o processo carcinogênico. Dessa forma, células adultas sofrem mutações múltiplas e desregulação epigenéticas que irão afetar o equilíbrio entre a autorrenovação e a diferenciação celular, favorecendo o desenvolvimento e progressão tumoral (SINGH *et al.*, 2015; PARRELLA, 2010).

A transformação de células normais em células malignas é o resultado de um processo que ocorre principalmente em três etapas: iniciação, onde ocorre dano ao DNA, isto é, as células sofrem efeito de um agente carcinogênico que provoca modificações em alguns de seus genes; promoção, onde mudanças genéticas e epigenéticas adicionais aumentam o dano genômico anterior causado; e progressão caracterizada pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível; com a doença já instalada localmente, invasiva ou metastática (ALMEIDA *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2002).

Os tumores sólidos são estruturas semelhantes a órgãos; no entanto, são heterogêneos e estruturalmente mais complexos. Eles compreendem as células cancerígenas e as células do estroma, como os fibroblastos e as células inflamatórias, que são incorporadas em uma matriz extracelular. Essa matriz alterada tem um número aumentado de fibroblastos que sintetizam fatores de crescimento, quimiocinas e moléculas de adesão (TRÉDAN *et al.*, 2007). Além disso, o câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que se originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Os carcinomas, por exemplo, são assim denominados quando se originam de tecidos epiteliais, glandulares (adenocarcinoma) ou do trofoblasto (coriocarcinoma). Nesse contexto, o câncer de mama é um adenocarcinoma que surge das células epiteliais de revestimento dos dutos glandulares mamários (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A angiogênese é o desenvolvimento de uma nova rede vascular a partir de vasos sanguíneos pré-existent, sendo importante para o crescimento do tumor e metástase. Entretanto, devido à formação acelerada, os vasos sanguíneos neoformados são frequentemente dilatados, se comparados com tecidos normais (Figura 2). Além disso, as paredes dos vasos tumorais podem ter fenestrações, membranas basais descontínuas ou ausentes, e podem não ter músculo liso perivascular. Tais alterações podem desempenhar um papel fundamental na quimioterapia do câncer (TRÉDAN *et al.*, 2007).

Figura 2 - Representação diagramática do sistema vascular. (A) Tecido normal. (B) Tumor sólido. Pode-se observar a presença dos vasos sanguíneos mal-formados, fenestrações, ramificações excessivas, dentre outras características (Adaptado de TREDAN *et al.*, 2007).



2.1.1 Quimioterapia do câncer

A resposta do tumor à quimioterapia é influenciada diretamente e indiretamente pelo sistema vascular anormal e o fluxo sanguíneo. Portanto, é através do sistema vascular tumoral que os agentes quimioterápicos são entregues de forma eficiente a todas as células tumorais. Além disso, a heterogeneidade dentro do microambiente do tumor conduz a gradientes marcantes na taxa de proliferação celular e para as regiões de hipóxia e acidez, os quais podem influenciar a sensibilidade das células tumorais para o tratamento dos fármacos (TRÉDAN *et al.*, 2007).

A quimioterapia teve início na década de quarenta com a descoberta da utilização das mostardas nitrogenadas como agentes alquilantes para o tratamento do câncer. Após 20 anos, foram desenvolvidos vários novos agentes alquilantes que poderiam ser administrados por via oral, como por exemplo, a ciclofosfamida e o clorambucil. Logo após a Segunda Guerra Mundial, surgiram os análogos de folato (antifolatos), como o metotrexato, que provou ter atividade antineoplásica em uma gama de doenças malignas, incluindo leucemia, câncer de mama, ovário, bexiga, cabeça e pescoço. Em 1950, outros quimioterápicos foram descobertos,

como os análogos de purina (6-mercaptopurina), seguidos pela descoberta dos alcaloides da vinca (CHABNER; ROBERTS JR, 2005).

Depois desse período, diversos agentes quimioterápicos foram descobertos, tais como 5-fluorouracil, um inibidor da síntese de DNA; os taxanos como o paclitaxel, um antimitótico dos anos 60; a camptotecina, inibidora da enzima topoisomerase I, capaz de reduzir o estresse de torção do DNA super-espiralado e a cisplatina, um alquilante do DNA (CHABNER; ROBERTS JR, 2005).

Idealmente, a quimioterapia deveria apenas destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, as capilares e as do sistema imunológico. É interessante que, além de especificidade, os antineoplásicos possuam uma elevada biodisponibilidade e uma meia vida longa tanto quanto administrado por via oral quanto por via intravenosa. Além disso, devem mostrar um perfil de toxicidade favorável em doses biologicamente efetivas, com efeitos limitados na medula óssea e no epitélio intestinal (ALMEIDA *et al.*, 2005; CHABNER E ROBERTS, 2005).

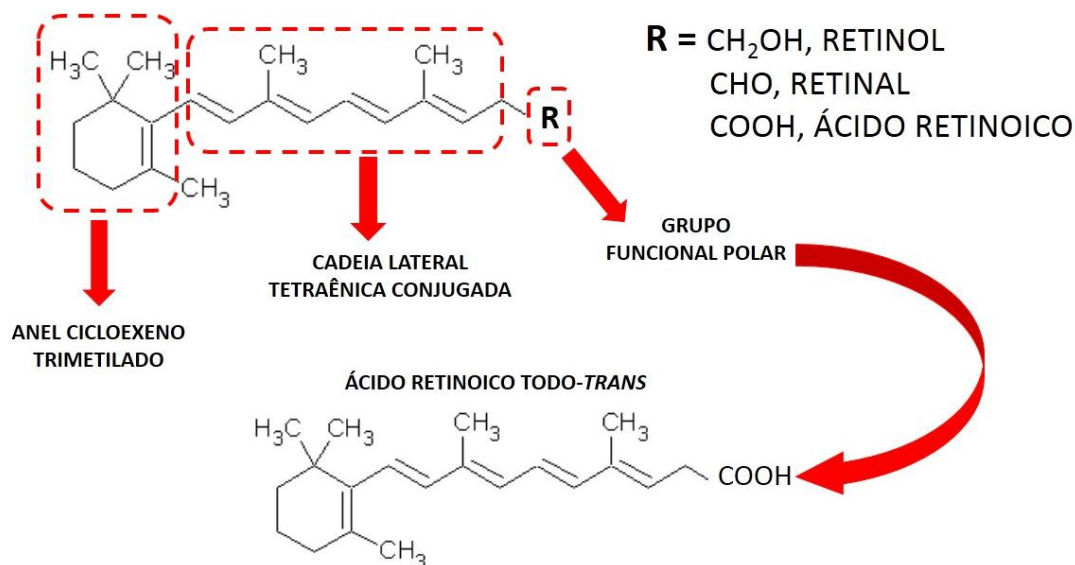
Por fim, quando comparados com outros fármacos, os citotóxicos apresentam baixa especificidade, elevada toxicidade e susceptibilidade para induzir resistência. Dessa forma, a incorporação desses fármacos em sistemas nanocarreadores lipídicos pode ser uma alternativa interessante para contornar o mecanismo de resistência aos fármacos, além de reduzir a toxicidade (YOSHIZAWA, Y. *et al.*, 2014).

2.2 Ácido Retinoico

Os retinoides são um grupo de moléculas lipofílicas derivadas da vitamina A, incluindo os seus análogos naturais e sintéticos. A estrutura básica de um retinoide é constituída por três partes: um anel cicloexeno trimetilado caracterizando um grupo volumoso hidrofóbico, uma cadeia lateral tetraênica conjugada, constituída por quatro unidades isoprenoides unidas de forma cabeça-cauda, que age como ligante, e um grupo funcional carbono-hidrogênio polar, que no caso do ácido retinoico todo-*trans* (AR), é um grupo ácido carboxílico, conforme mostrado na figura 3. O AR é um composto altamente lipofílico, pouco solúvel em água, mas solúvel em metanol e etanol. Além disso, devido à presença das duplas ligações conjugadas,

torna-se um composto instável, uma vez que estas ligações podem sofrer facilmente oxidação e/ou isomerização na presença de oxidantes, luz ou calor excessivo (DAS *et al.*, 2014).

Figura 3 – Estrutura química básica dos retinoides, com o destaque para o AR (Adaptado de DAS *et al.*, 2014).



Os retinoides exercem importantes funções em praticamente todas as células, principalmente na visão e nos processos de proliferação e diferenciação celular (TANG e GUDAS, 2011). O AR é um dos metabólitos ativos dos retinoides que regula a expressão de genes alvo por meio da ligação e ativação dos receptores de retinoides nucleares: receptores para ácido retinoico (RAR) e receptores retinoide X (RXR). O AR tem sido amplamente estudado por inibir a proliferação de células cancerosas, geralmente, por meio do bloqueio do ciclo celular na fase G_1 (ORTIZ *et al.*, 2002). O AR pode ser efetivo para o tratamento de linfoma, leucemia, melanoma, câncer de pulmão, câncer de colo uterino, câncer de rim e carcinomas mamários, mas seu uso clínico mais eficaz tem sido no tratamento de leucemia promielocítica aguda (BUSHUE; WAN, 2010).

A biodisponibilidade do AR, administrado por via oral, é reduzida e isto pode ser atribuído à sua lipofilicidade ($\log P = 4,6$) e baixa solubilidade em água (ABDULMAJED e HEARD, 2004), o que também constitui um obstáculo para formas farmacêuticas convencionais de administração intravenosa (MUINDI *et al.*, 1992). Além disso, o tratamento prolongado proporciona redução nas concentrações plasmáticas, por aumentar o seu metabolismo.

A incorporação de AR, um fármaco lipofílico e muito pouco solúvel em água, em nanocarreadores lipídicos constitui uma alternativa interessante para viabilizar sua administração intravenosa em substituição ao uso oral. Entretanto, o teor de encapsulação do AR em nanocarreadores lipídicos é baixo (menos de 1 % em relação à concentração total de lípidos) (JENNING e GOHLA, 2001), exceto quando é utilizada uma relação tensoativo/lípide elevada (HU *et al.*, 2004; LIM e KIM, 2002). Como uma alternativa, CASTRO *et al.* (2009) relataram o desenvolvimento de uma nova formulação de NLS carregada com AR com elevado teor de encapsulação, graças à formação de um par iônico entre o AR e uma amina lipofílica, a SA. Esta formulação, desenvolvida para o tratamento tópico da acne, mostrou uma excelente estabilidade, baixa toxicidade e apresenta um potencial para uso no tratamento de outras doenças como o câncer.

Seguindo a lógica de formação de um par iônico, uma formulação de NLS utilizando a formação de um par iônico entre o AR e duas aminas lipofílicas, SA e benetamina (BNT), foi desenvolvida por CARNEIRO *et al.*, (2012) e sua atividade anticâncer foi avaliada utilizando-se células de carcinoma mamário humano (MCF-7) e leucemia (Jurkat e HCT-116). Assim como observado para a SA, a BNT também possibilitou elevado teor de encapsulação para o AR. Além disso, cabe ressaltar que a formulação desenvolvida apresentou aumento significativo na atividade citotóxica em relação ao AR livre, com importante aumento na atividade apoptótica do AR.

Nesta mesma linha de pesquisa, foram desenvolvidos CLN e NLS utilizando BNT e maprotilina (MPT) para a formação *in situ* de um par iônico com AR. A presença das aminas aumentou significativamente o teor de encapsulação do AR nas NLS e nos CLN. A avaliação da viabilidade celular, as análises do conteúdo de DNA subdiploide e das fases do ciclo celular revelaram maior atividade para o AR encapsulado em comparação ao AR livre. Desta forma, a abordagem envolvendo a encapsulação de pares iônicos com AR pode ser usada para aumentar a eficácia e biodisponibilidade do AR no tratamento da leucemia e outros tipos de câncer, assim como no controle de doenças metabólicas nas quais este retinoide apresenta papel importante (SILVA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016).

2.3 Nanocarreadores Lipídicos

A solubilidade aquosa de fármacos altamente lipofílicos representa um grande desafio no desenvolvimento de medicamentos para administração parenteral. Diversas estratégias são

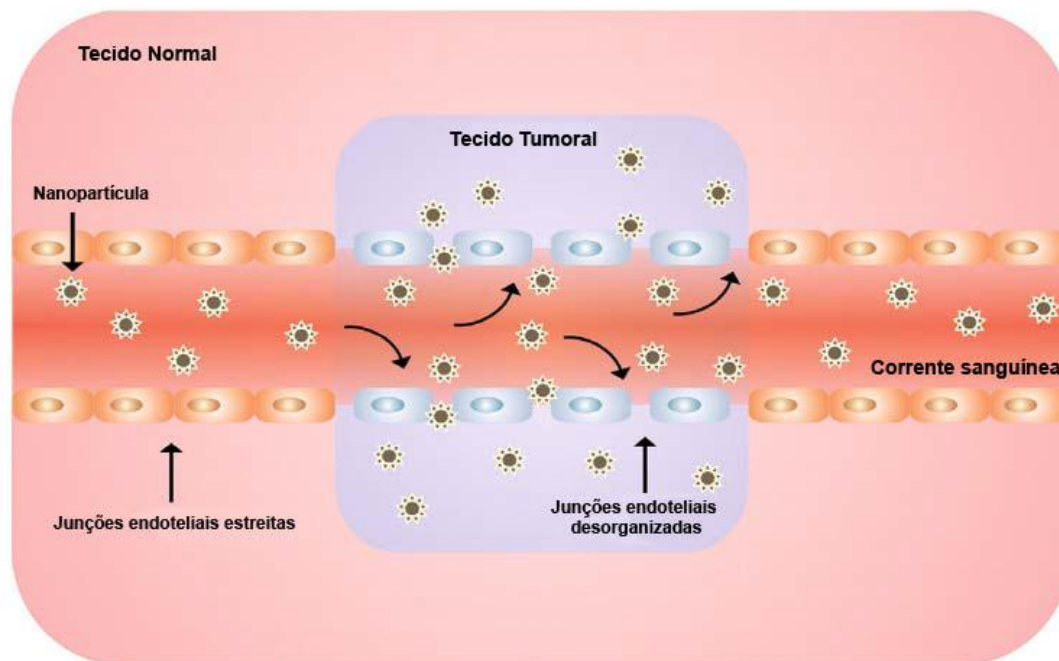
descritas na literatura para esta finalidade, destacando: modificação do pH do veículo, adição de co-solventes, utilização de ciclodextrinas, ou ainda sistemas nanoestruturados lipídicos, tais como NE, NLS e lipossomas.

Recentemente, esses sistemas lipídicos têm sido muito utilizados no carreamento de antineoplásicos, por apresentarem diversas vantagens quando comparados às formas farmacêuticas convencionais, como maior eficácia terapêutica; liberação controlada; direcionamento do fármaco a um determinado alvo; redução significativa dos efeitos tóxicos associados ao fármaco ou até mesmo aos adjuvantes da formulação convencional; menor dosagem empregada na administração, pela capacidade do fármaco de superar a resistência oferecida por algumas barreiras biológicas; oferece uma maior proteção à degradação enzimática ou inativação química; além de poder ser utilizado por diversas vias de administração (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

Os nanossistemas têm sido utilizados como carreadores de fármacos lipofílicos, para estabilização de compostos suscetíveis a hidrólise e redução da irritação ou toxicidade do fármaco. Além disso, uma das principais características dos nanocarreadores é a capacidade de acumular na região de interesse facilitando a liberação do fármaco no sítio alvo o que, conseqüentemente, pode reduzir a dose necessária para alcançar o efeito terapêutico. (LIECHTY *et al.*, 2010; TORCHILIN, 2012). Esse efeito de direcionamento de nanossistemas, no contexto do tratamento de tumores, pode ocorrer de forma passiva ou ativa.

O direcionamento passivo ocorre por meio de acúmulo do fármaco na região tumoral, em função do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR). Nos tumores sólidos, o revestimento endotelial da parede do vaso sanguíneo é mais permeável, possuindo fenestrações que permitem a passagem de grandes moléculas e partículas de tamanho variando entre 10 e 500 nm. Dessa forma, nanossistemas carreando fármacos podem ser levados espontaneamente para a área tumoral pela circulação sanguínea, liberando o agente ativo no local. Além disso, o sistema de drenagem linfática do tumor normalmente está comprometido, o que possibilita uma retenção aumentada das nanopartículas que atingirem o local (Figura 4). Para que o efeito de EPR seja efetivo, é necessário que o sistema nanoestruturado apresente uma circulação prolongada na corrente sanguínea, possibilitando maior acúmulo na região tumoral (MOONEY, 2005; TORCHILIN, 2011). O direcionamento passivo tem trazido vantagens claras à quimioterapia, como a melhora da adesão do paciente ao tratamento, maior tolerância ao fármaco e diminuição dos efeitos adversos quando comparada com as formas farmacêuticas convencionais (ZHONG *et al.*, 2014).

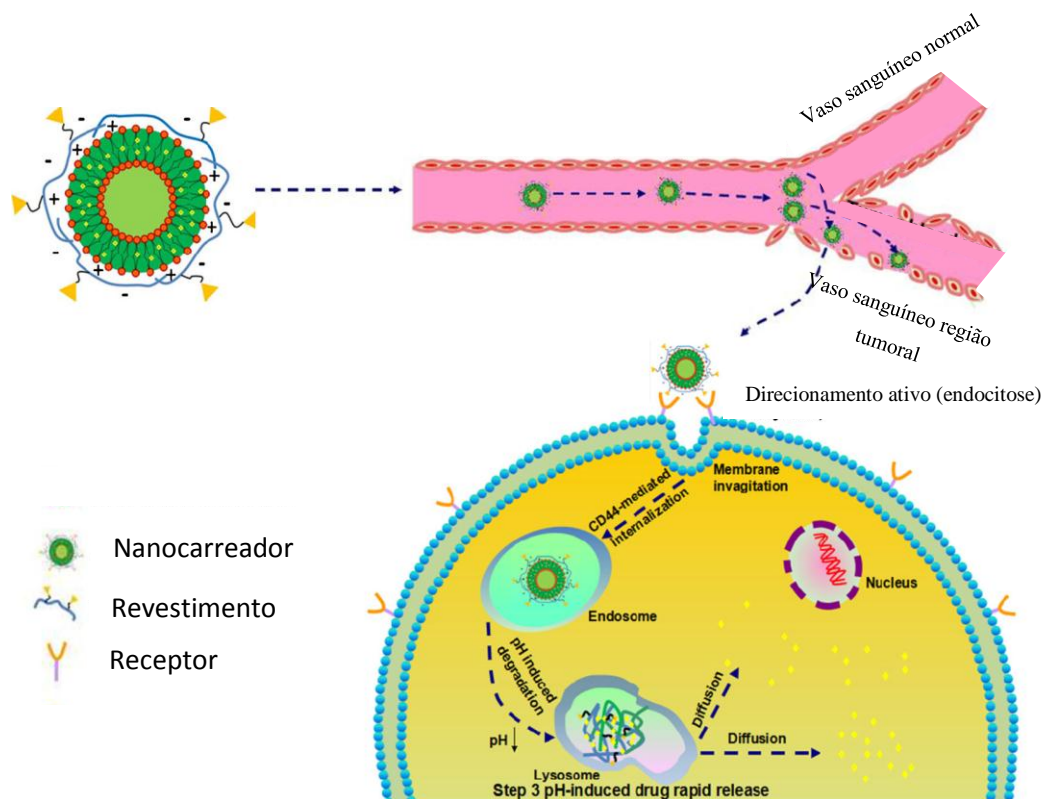
Figura 4 – Representação esquemática do direcionamento de nanopartículas para a região tumoral por meio do EPR (Adaptado de PRAKASH *et al.*, 2011).



Por outro lado, a captação ativa é alcançada pela utilização de ligantes sítio-específicos em nanocarreadores de superfície modificada (MEDINA *et al.*, 2004; SURENDIRAN *et al.*, 2008). Esses sistemas caracterizam-se por possuir em suas superfícies moléculas ligantes que atuam reconhecendo de forma específica moléculas de superfícies ou receptores expressos em determinados locais ou células (BATISTA *et al.*, 2007; SAWANT; TORCHILIN, 2012). Dentre os ligantes utilizados estão peptídeos, oligossacarídeos, anticorpos, ácidos nucleicos e pequenas moléculas como vitaminas (BERTRAND *et al.*, 2014).

A escolha do ligante a ser incluído na superfície do nanocarreador deve estar relacionada com a especificidade da região de interesse, uma vez que a captação deve ser direcionada a um determinado órgão ou tecido. Assim, é interessante que sejam ligantes para receptores ou substâncias que sejam sobreexpressos nas células acometidas por determinada doença e que sejam ausentes ou minimamente expressos em tecidos saudáveis (WANG; THANOU, 2010). A figura 5 mostra um exemplo de células tumorais sobreexpressando um tipo de receptor. Após o reconhecimento do seu ligante específico, através da ligação sítio ativo do receptor na célula tumoral, o nanocarreador é internalizado, podendo liberar o fármaco em nível intracelular (ZHONG *et al.*, 2014).

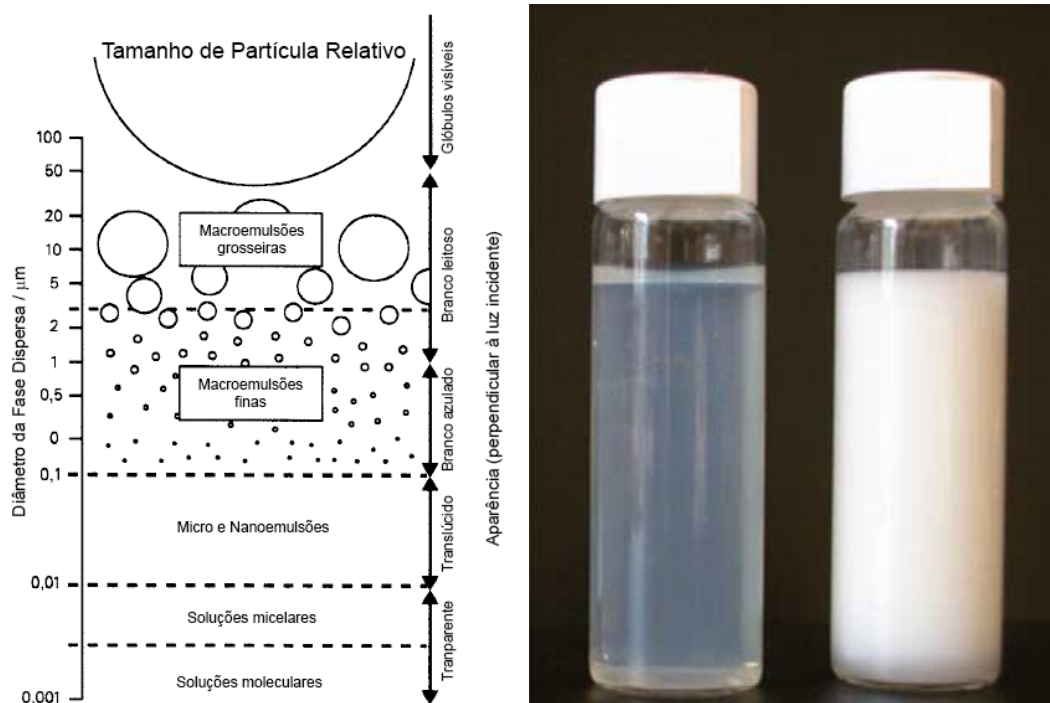
Figura 5 – Direcionamento ativo de nanocarreadores lipídicos com ligante de superfície (Adaptado de SONG *et al.*, 2014).



2.3.1 Nanoemulsões

As nanoemulsões (NE) são sistemas heterogêneos nos quais um líquido imiscível ou praticamente imiscível é disperso na forma de gotículas em outro líquido, sendo que essas gotículas apresentam tamanho na escala nanométrica (figura 6-A), normalmente na faixa de 20-200 nm (SOLANS *et al.*, 2005). Invariavelmente, um desses líquidos é a água ou solução aquosa, constituindo a fase aquosa e o segundo líquido é constituído por óleos ou substâncias mais lipofílicas, geralmente compostos por triglicerídeos de cadeia média ou longa. Este sistema é estabilizado termodinamicamente através da adição de um emulsificante ou mistura de emulsificantes. As NE também são citadas na literatura como emulsões submicrométricas e emulsões ultrafinas. Além disso, devido às suas características de tamanho na escala nanométrica as NE podem ser translúcidas a olho nu, conforme a figura 6-B (BENITA e LEVY, 1993; SOLANS *et al.*, 2005).

Figura 6 - Fotografia de uma nanoemulsão (à esquerda) e uma macroemulsão (à direita), com tamanho de glóbulo de 35 nm e 1 μm , respectivamente (SOLONS et al., 2005).



Vários métodos de fabricação de NE têm sido descritos na literatura, podendo ser divididos em métodos de alta energia e de baixa energia. Dentre os métodos de alta energia os mais citados são a homogeneização em alta pressão e a microfluidização. Já dentre os métodos de baixa energia os mais utilizados são o de inversão de fases e o de emulsificação espontânea. A correta escolha do método de preparo é importante, uma vez que ele influencia diretamente nas propriedades físico-químicas da NE formada (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Os processos de alta energia utilizam dispositivos mecânicos capazes de gerar forças de cisalhamento intensas que podem quebrar estruturas da ordem de micrometros em nanômetros. Normalmente, nos processos de emulsificação por alta energia é produzida inicialmente uma emulsão grosseira com tamanho de gotículas grande, que é forçada a passar por um sistema com introdução de forças de cisalhamento que irão reduzir o diâmetro médio de gota (MCCLEMENTS e RAO, 2011). O método mais amplamente descrito para obtenção de NE carreadoras de fármacos é a homogeneização à alta pressão, o qual consiste na passagem de uma dispersão grosseira por um orifício, sob pressão elevada, em turbulência intensa. Outro método de alta energia também muito utilizado é a microfluidização. Nos microfluidizadores a emulsão é forçada por alta pressão a escoar por dois orifícios, formando duas correntes que são

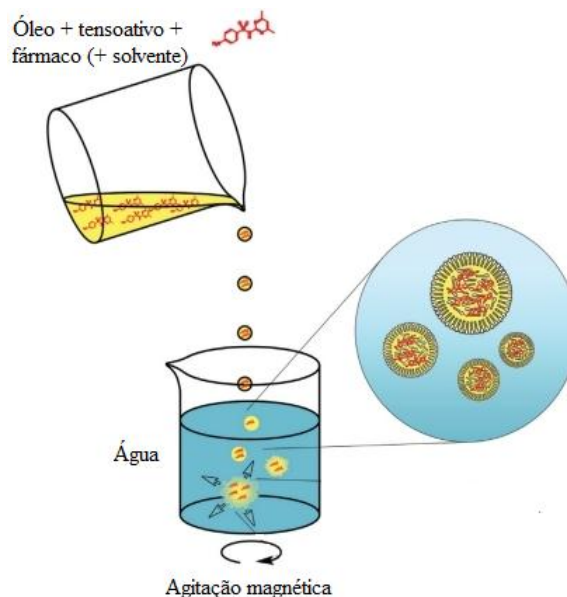
direcionadas para uma câmara de interação onde ocorre a colisão desses fluxos e forças de cisalhamento são geradas levando a desestabilização das gotas e transformando-as em gotículas menores (BRUXEL *et al.*, 2012; HATANAKA *et al.*, 2010).

Os métodos de baixa energia são baseados nas transições de fase que ocorrem durante o processo de emulsificação. A técnica de inversão de fases é amplamente empregada pelas indústrias e consiste na conversão de uma emulsão óleo/água (O/A) para uma emulsão água/óleo (A/O) ou vice-versa. Inicialmente ocorre lentamente a adição da fase aquosa em uma fase oleosa sob agitação, gotas de água são formadas dentro da fase oleosa (A/O). Assim a formação de NE é realizada forçando uma transição da emulsão A/O em altas temperaturas para uma emulsão O/A em baixas temperaturas. Durante o resfriamento o sistema tensoativo passa por um ponto de curvatura zero e mínima tensão interfacial, o que predispõe a formação de gotículas finamente dispersas. Entretanto, não é um método indicado para substâncias termolábeis (ANTON *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2004).

O procedimento de emulsificação espontânea (Figura 7) consiste na solubilização prévia dos componentes da fase oleosa em um solvente orgânico, que é adicionado na fase aquosa sob agitação. Em seguida, procede-se à retirada do solvente, normalmente por evaporação em pressão reduzida. A formação das gotículas ocorre quando a fase orgânica é vertida na fase aquosa, provocando uma turbulência interfacial durante a difusão do solvente orgânico na água. Observa-se um rápido espalhamento da interface, como resultado da difusão mútua dos solventes, fornecendo energia suficiente para a formação das gotículas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; MARTINI *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 1999).

A vantagem dessa técnica é a possibilidade de fabricação de pequenos lotes de formulação em baixas temperaturas, sendo interessante para a incorporação de substâncias termolábeis. Além disso, é um procedimento rápido, simples e de baixo custo (TEIXEIRA *et al.*, 2002).

Figura 7– Procedimento geral para o preparo de NE por emulsificação espontânea (Adaptado de VADAMME & ANTON, 2010).



Assim, as NE têm sido utilizadas como carreadores de fármacos lipofílicos, para estabilização de compostos suscetíveis à hidrólise e redução da irritação ou toxicidade do fármaco. Também têm sido utilizadas como sistema de liberação sustentada através da formação de depósitos após injeção subcutânea e como sistema de liberação de fármaco sítio-específico por meio da interação de ligantes como o AH na superfície do glóbulo com receptores da superfície celular (SANTOS-MAGALHAES *et al.*, 2000).

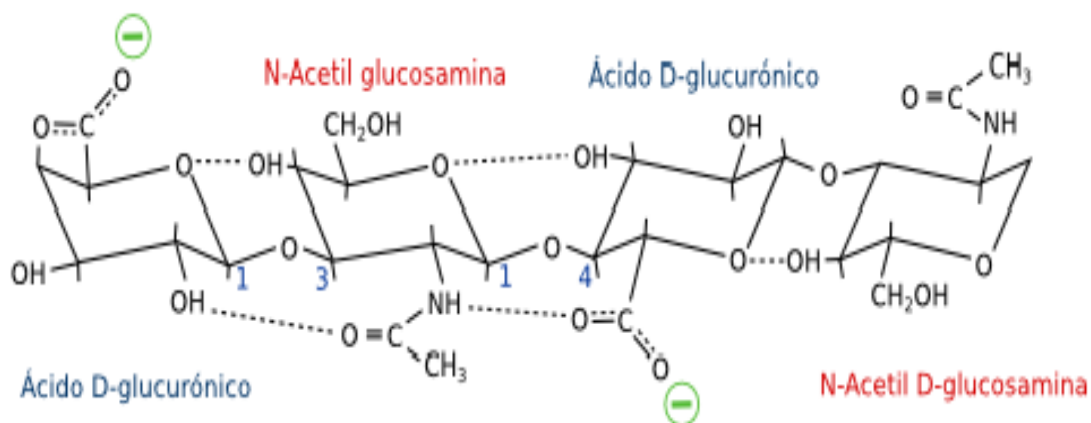
2.4 Ácido Hialurônico

O AH (Figura 8), uma das principais glicosaminoglicanas constituinte de matrizes extracelulares, é um biopolímero de cadeia linear com carga negativa, cuja estrutura é formada pela repetição dissacarídica de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina. Ele foi isolado pela primeira vez por Karl Meyer e John Palmer em 1934 a partir do humor vítreo bovino, sendo que o nome “ácido hialurônico” foi proposto através de uma conjugação de duas palavras, hialóide (vítreo) e ácido urônico. Em condições fisiológicas normais, a massa molecular do AH pode variar de 10^5 a 10^7 Dalton, apresentando 2 a 2,5 μm de comprimento (MEYER & PALMER, 1994; TOOLE, 2004; HYUNG *et al.*, 2008; KARIMI, *et al.*, 2013).

Fisiologicamente, o AH possui uma importante função de preenchimento dos espaços intercelulares, sendo responsável inclusive pelo volume da pele, forma dos olhos e lubrificação das articulações. Além disso, o AH possui a capacidade de se ligar ao receptor CD44 levando a efeitos fisiológicos importantes, como agregação celular, migração, proliferação e ativação; adesão entre células e entre célula e substrato; e endocitose do próprio AH para sua degradação em macrófagos (CHOI *et al.*, 2012; HAMITON *et al.*, 2007).

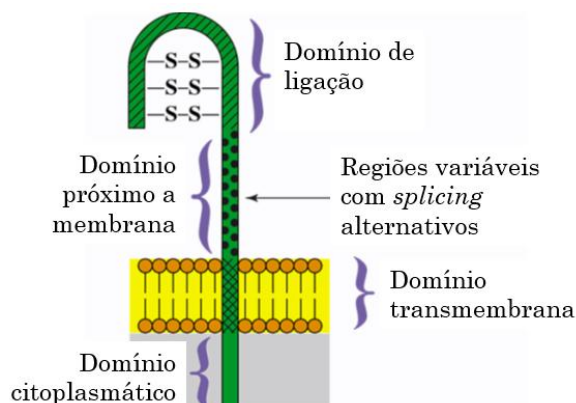
No câncer, os níveis de AH normalmente estão associados a malignidade e prognóstico ruim. Assim, ele pode ser utilizado inclusive como marcador tumoral para câncer de próstata e mama, podendo monitorar a progressão da doença e contribuindo especialmente para a metástase e espalhamento do câncer (HAMITON *et al.*, 2007; POZDNYAKOVA *et al.*, 2009).

Figura 8 – Estrutura química do ácido hialurônico.



O receptor CD44 (figura 9) é uma molécula de adesão, multifuncional e multiestrutural, pertencente à família de glicoproteínas transmembrana e está intimamente relacionada com a progressão tumoral, além de estar envolvida nas interações entre células e entre célula e matriz (NAOR *et al.*, 1997; KLINGBEIL *et al.*, 2009). Este receptor é codificado por um gene de 20 exons, sendo que os cinco primeiros e os cinco últimos são constantes e, 10 deles estão sujeitos a regiões variáveis com *splicing* alternativos de RNA nuclear (NAOR *et al.*, 1997). Essa região de variabilidade da molécula confere várias isoformas de papéis diversos em suas estruturas e funções (GOTTE & YIP, 2006).

Figura 9– Estrutura do receptor CD44 (Adaptado de TOOLE *et al.*, 2002).



As principais isoformas são CD44-padrão e CD44std e ambas são sobreexpressas em linhagens de câncer mais invasivas. O mecanismo de ligação do AH ao receptor CD44 ocorre em um domínio extracelular, enquanto a cauda citoplasmática ativa as vias de sinalização intracelular que regulam a sinalização das associações dos filamentos de actina no citoesqueleto (HAMILTON *et al.*, 2007).

O CD44 é um receptor expresso em células inflamatórias ativadas e alguns tipos de células tumorais, como mama, ovário, cólon, pulmão e estômago (SHERIDAN *et al.*, 2006; HAMILTON *et al.*, 2007; HYUNG *et al.*, 2008; ALMALIK, DAY, *et al.*, 2013). Nesse contexto, o AH pode ser uma alternativa promissora em revestimento de sistemas nanoestruturados para promover direcionamento seletivo para tumores que sobreexpressam receptor CD44, além de promover aumento do tempo de permanência na circulação sanguínea, resultante da superfície hidrofílica do AH (KARIMI, *et al.*, 2013; TRAN *et al.*, 2014).

2.4.1 Métodos de Revestimento com Ácido Hialurônico

Em geral, o revestimento de um nanossistema pode ser realizado por dois métodos: modificação química e atração eletrostática (HYUNG *et al.*, 2008). Para realizar alguma modificação química no caso do AH, pode-se realizar uma reação de conjugação explorando os grupos funcionais ácido carboxílico e as hidroxilas presentes neste polímero. Como exemplo, tem-se nanopartículas revestidas com AH a partir da reação química entre o grupo carboxílico

do ácido D-glicurônico do AH e o grupo amina da etildiamina, formando um grupo amida (HYUNG *et al.*, 2008; TRIPODO *et al.*, 2015).

Por outro lado, o revestimento por atração eletrostática acontece entre algum componente catiônico e o ânion AH. YANG e colaboradores (2013), por exemplo, desenvolveram CLN contendo paclitaxel revestidos com AH (CLN-AH) por atração eletrostática com o brometo de hexadecil trimetilamônio, presente na matriz lipídica. A citotoxicidade dos CLN-AH contra três linhagens celulares tumorais (B16, CT26 e HCT 116) que sobreexpressam o receptor CD44, foi superior à citotoxicidade dos CLN não revestidos, do Taxol® e do fármaco livre. Além disso, os CLN-AH apresentaram aumento da atividade antitumoral e melhor tolerabilidade em camundongos quando comparado com o Taxol®, a formulação comercial do paclitaxel, devido ao acúmulo deste antineoplásico no tumor e por prolongar o tempo de circulação sanguínea do fármaco.

Song e colaboradores (2014) desenvolveram nanocarreadores multifuncionais de docetaxel baseados nas propriedades de pH-sensibilidade e revestimento com AH. O revestimento foi realizado por atração eletrostática, entre os componentes hemisuccinato de colestera (CHEMS), que possui carga positiva, e AH. Os nanocarreadores revestidos aumentaram a inibição do crescimento nas linhagens celulares MCF-7 e A549 e a eficácia antitumoral em camundongos Balb/c quando comparado ao Taxotere®, a formulação comercial de docetaxel.

Tran e colaboradores (2014) desenvolveram NLS de vorinostat revestidas com AH para direcionamento a linhagens tumorais sobreexpressoras do receptor CD44 (A549 e SCC-7) e com menores níveis de CD44 (MCF-7). A incorporação do AR nos nanossistemas revestidos promoveu aumento na atividade citotóxica nas linhagens celulares testadas em relação ao fármaco livre e às NLS não revestidas. Além disso, as NLS revestidas aumentaram o tempo de circulação sanguínea e diminuíram o *clearance* do vorinostat em ratos, resultando em um aumento da concentração plasmática e da biodisponibilidade.

Assim, o revestimento com AH pode promover o direcionamento dos nanossistemas para determinados tumores e consequente acúmulo do fármaco neste sítio, aumentando a eficácia terapêutica sem promover o aumento dos efeitos adversos. Diante do exposto, o desenvolvimento de NE contendo AR e posteriormente revestidas com AH torna-se interessante devido ao seu potencial para aumentar o direcionamento a células tumorais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antineoplásica *in vitro* de nanoemulsões contendo ácido retinoico revestidas por ácido hialurônico.

3.2 Objetivos específicos

- Validar um método analítico espectrofotométrico para a determinação de ácido retinoico em nanossistemas lipídicos.
- Avaliar a influência da composição e do método de preparo das nanoemulsões sobre suas características físico-químicas.
- Caracterizar as formulações desenvolvidas quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta.
- Determinar o teor de encapsulação do AR e analisar a presença de cristais de AR não-encapsulado.
- Avaliar a influência da concentração de ácido hialurônico para o revestimento das NE-AR.
- Verificar a eficiência do revestimento das NE-AR.
- Avaliar a estabilidade preliminar das nanoemulsões desenvolvidas.
- Avaliar a influência da encapsulação e do revestimento das nanoemulsões na citotoxicidade *in vitro* do AR em linhagens celulares de câncer de mama e fibroblastos normais.

CAPITULO 1

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA PARA DOSEAMENTO DE ÁCIDO RETINOICO EM NANOEMULSÕES

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos que permitam quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados é fundamental para o controle de qualidade no âmbito das pesquisas e na indústria farmacêutica (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2008). A escolha do método de quantificação baseia-se em vários fatores que incluem estrutura e características do fármaco, pureza, quantidade da amostra, disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, bem como etapas de preparo da amostra. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associada a diferentes tipos de detectores tem representado o método de escolha para o desenvolvimento dos principais métodos analíticos e bioanalíticos (RAO *et al.*, 2005).

A validação de um método estabelece, mediante estudos sistemáticos, que o mesmo é adequado à finalidade requerida, ou seja, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do questionamento analítico, assegurando a confiabilidade dos resultados. No Brasil, a validação de métodos analíticos e bioanalíticos é regulamentada pela RE nº 899, de 2 de junho de 2003 (ANVISA, 2003), mas as diretrizes da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) também são consultadas para se estabelecer critérios na validação de métodos analíticos (ICH, 2005).

Os métodos atuais para quantificação dos retinoides normalmente empregam CLAE normal ou de fase reversa com detecção no ultravioleta-visível (UV-VIS). Este método, apesar de fornecer a seletividade requerida para isolar diferentes formas de retinoides, é bastante dispendioso, com um tempo de análise elevado. A detecção por fluorescência também tem sido investigada como um meio de melhorar a sensibilidade na detecção dos retinoides (Hagen *et al.*, 2006). Além dos métodos analíticos citados, tem sido utilizada a fluorimetria, a quimioluminescência, a espectrofotometria e a eletroquímica (ZIYATDINOVA *et al.*, 2010).

Para a determinação do teor de encapsulação do AR em NE, a utilização de um método que seja seletivo para quantificar o AR na presença dos excipientes é fundamental para melhor caracterizar o nanossistema formado. A busca por métodos que apresentem seletividade e sensibilidade consideráveis, bem como de baixo tempo total de análise e baixo gasto de materiais, pode ser uma alternativa interessante aos métodos de análise já consagrados, tais como a CLAE.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

O AR foi fornecido pela BASF (Ludwigshafen, Alemanha). Estearilamina (SA) e colesterol foram obtidos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, EUA). Monooleato de sorbitano etoxilado de grau super refinado (Polissorbato 80; SuperRefined Tween80®) e Crodamol® GTCC (triglicérides do ácido cáprico e caprílico) foram cedidos pela Croda Inc (Edison, EUA). Lecitina de ovo (Lipoid® E-80) foi fornecida pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Todos os demais reagentes e solventes utilizados, metanol, tetrahidrofurano (THF), ácido clorídrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, foram de grau analítico ou espectrofotométrico.

2.1.1 Equipamentos

As análises espectrofotométricas foram realizadas utilizando espectrofotômetro CIRRUS 80 MB UV-VIS, que apresenta as seguintes características: único feixe de 190 - 1100 nm, bandas espectrais de 0,5; 1,0 e 2,0 nm, e *software* Cirrus Application 1.7. Além disso, células de quartzo 1,0 cm de caminho óptico e balança analítica EDUTECH® com precisão 0,0001g, modelo 02001002.

Em todas as análises, o equipamento foi zerado com solvente de trabalho: mistura de metanol e hidróxido de sódio 0,1 M (50:50). Em análises envolvendo as NE, 0,03% de THF foi adicionado a essa mistura para zerar o equipamento.

2.2 Desenvolvimento do método analítico

2.2.1 Preparo das soluções estoque dos fármacos

A solução estoque de AR foi obtida pesando-se exatamente cerca de 10 mg do fármaco para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com o solvente THF e homogeneizou-se, obtendo uma solução na concentração de 1000 µg/mL.

2.2.2 Seleção e otimização das condições espectrofotométricas

A determinação do comprimento de onda foi feita a partir da solução estoque de AR 1000 µg/mL devidamente diluído em metanol e hidróxido de sódio 0,1 M (50:50). Transferiu-se 500µL da solução estoque para um balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com os solventes, metanol e hidróxido de sódio 0,1M (50:50) e homogeneizou-se. A partir dessa solução a 50µg/mL, pipetou-se 600µL para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com os mesmos solventes. Homogeneizou-se a solução de concentração de 3µg/mL e, em seguida, programou-se o espectrofotômetro para varredura espectral de 200 a 400 nm, de 1 em 1 nm. Obteve-se o espectro de ordem zero para o fármaco e determinou-se o comprimento de onda máximo para o mesmo.

2.3 Validação do método analítico

O método analítico para doseamento de NE contendo AR (NE-AR) foi validado de acordo com as especificações recomendadas pela Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 e *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (BRASIL, 2003; INTERNACIONAL, 2005). Assim, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão intra-dia, precisão inter-dias, exatidão e robustez.

2.3.1 Seletividade

2.3.1.1 Seletividade em relação aos excipientes da formulação

A seletividade do método foi determinada pela análise de possíveis interferentes presentes na mistura de excipientes da formulação (placebo) que podem interferir na leitura da absorbância do analito. Para isso, formulou-se uma NE branco contendo os excipientes nas proporções utilizadas para o preparo da NE: triglicérides de cadeia média, SA, lecitina, glicerol, Tween® 80 e água.

Assim, transferiu-se 60 µL de NE para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 300 µL de THF e homogeneizou-se até a solubilização completa. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol e hidróxido de sódio 0,1M (50:50). A solução foi filtrada em membrana de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore, Billerica, EUA) e zerou-se o espectrofotômetro com o mesmo solvente, incluindo o THF. As leituras de três soluções foram realizadas em triplicata, no comprimento de onda de 324 nm.

2.3.1.2 Estudo de degradação forçada

Para demonstrar a seletividade do método, avaliou-se também a estabilidade do AR frente a condições de estresse, como exposição a luz solar, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, hidrólise neutra e oxidação (Tabela 1).

O estudo da estabilidade intrínseca do AR frente a exposição a luz solar foi realizado a partir da solução estoque de AR devidamente diluído. Transferiu-se 500 µL da solução estoque para um balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com mistura de metanol e hidróxido de sódio 0,1 M (50:50) e homogeneizou-se. A partir dessa solução a 50 µg/mL, pipetou-se 600 µL para um balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com os mesmos solventes e homogeneizou-se. Em seguida, esta solução (concentração 3 µg/mL) foi exposta à luz solar por 10 e por 30 minutos. Após esse período a solução foi submetida a uma varredura espectral.

O estudo de estabilidade do AR frente a condições de estresse, como hidrólise ácida, hidrólise alcalina, hidrólise neutra e oxidação, foi adaptado do estudo com o cloridrato de diltiazem (NOGUEIRA, 2007; CHATPALLIWAR *et al.*, 2012). Para a preparação da solução estoque do fármaco, foram transferidos exatamente cerca de 15,0 mg de AR para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com metanol e hidróxido de sódio 0,1M (50:50) e a solução foi homogeneizada, obtendo-se concentração de 1500µg/mL. Pipetou-se uma alíquota de 1 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 10mL (150µg/mL).

As soluções para o estudo de degradação foram preparadas conforme Tabela 1. No tubo 5, não foi adicionada a solução estoque, apenas 10 mL de metanol e hidróxido de sódio 0,1M (50:50) para servir de branco da reação. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 50 °C por 24 horas. Foram retiradas dos tubos alíquotas de 400 µL, nos tempos 0, 1, 2, 3, 6 e 24 horas, que foram transferidas para um balão volumétrico de 10 mL (3µg/mL) e, em seguida, submetidas a varredura espectral.

2.3.2 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada construindo-se três curvas de calibração para AR em sete níveis de concentração, na faixa de 50 a 150% da concentração de trabalho de AR (3 µg/mL).

Para a construção da curva analítica, foi preparada uma solução estoque de AR. A solução padrão estoque foi preparada pesando-se exatamente cerca de 10 mg de AR e transferindo-se para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com THF e a solução homogeneizada, obtendo-se concentração de 1000µg/mL. Transferiu-se uma alíquota de 500 µL da solução anterior para um balão volumétrico de 10 mL (50µg/mL).

Tabela 1– Protocolo do estudo de degradação do AR.

Tubos	Conteúdo
1	5 mL da solução estoque + 5 mL de ácido clorídrico 0,2 M
2	5 mL da solução estoque + 5 mL de hidróxido de sódio 0,02 M
3	5 mL da solução estoque + 5 mL de água ultrapura
4	5 mL da solução estoque + 5 mL de peróxido de hidrogênio 6% (v/v)
5	10 mL de metanol e hidróxido de sódio 0,1M (50:50)

As curvas analíticas foram construídas por meio de diluições sucessivas da solução padrão de AR a 50µg/mL (Tabela 2). A curva analítica foi obtida plotando-se as absorbâncias em um gráfico de concentração versus absorbância. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados ordinários.

Tabela 2– Tomada de amostra para preparo das soluções de AR na construção das curvas analíticas.

Alíquotas (µL)	Concentração (µg/mL)	Nível de concentração
300	1,5	50%
400	2,0	67%
500	2,5	83%
600	3,0	100%
700	3,5	117%
800	4,0	133%
900	4,5	150%

Para verificar se os dados de regressão linear atendem às premissas para o método dos mínimos quadrados ordinários, foram utilizados os testes estatísticos e respectivas hipóteses conforme tabela 3.

Tabela 3– Testes estatísticos aplicados à regressão linear

Outliers	Normalidade	Homocedasticidade	Independência
Resíduo Jackknife	Ryan-Joiner	Levene modificado	Durbin-Watson
Há outliers?	Dados seguem a distribuição normal?	Dados são homocedásticos?	Dados são independentes?

2.6.3 Precisão

A precisão foi avaliada preparando-se seis soluções a 100% da concentração de trabalho. As soluções foram preparadas transferindo-se 60 µL de NE-AR para balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, adicionou-se 300 µL de THF e homogeneizou-se até a solubilização completa, completando-se o volume do balão com metanol e hidróxido de sódio 0,1M (50:50). A solução foi filtrada em membrana de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore, Billerica, EUA) e a leitura das absorbâncias foi realizada em 324 nm em triplicata. Foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) referente aos teores encontrados ($n = 6$), que deve ser inferior a 5% (BRASIL, 2003).

A precisão inter-dias foi avaliada realizando-se o mesmo procedimento descrito para a precisão intra-dia, com seis amostras em 100% da concentração de trabalho, preparadas em um dia diferente. Calculou-se o DPR referente aos teores encontrados de AR nos dois dias de análise ($n = 12$), que deve ser inferior a 5% (BRASIL, 2003).

2.6.4 Exatidão

A exatidão foi realizada pelo método de adição e recuperação por contaminação do placebo, em que quantidades conhecidas do analito são adicionadas a misturas dos excipientes da formulação com o intuito de determinar a porcentagem de recuperação do analito. A exatidão foi avaliada a partir de nove determinações contemplando os níveis: baixo, médio e alto (67%, 100% e 133%) da concentração de trabalho para AR. A recuperação foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, utilizando-se a equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Segundo GREEN (1996), como critério de aceitação para a média de recuperação, em um método analítico de doseamento, deve ser de $100 \pm 2\%$, ou seja, a recuperação deve estar compreendida na faixa 98% a 102% em cada nível.

2.6.4 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso rotineiro. Os parâmetros avaliados no estudo de robustez foram: variação da concentração de hidróxido de sódio em 0,1 M, 0,01M 0,001M e uso de metanol obtido a partir de fornecedores diferentes. Foram preparadas três soluções de AR e NE-AR a 3 µg/mL para cada parâmetro avaliado. Todas as análises foram realizadas em sextuplicata.

Para verificar se a variação do parâmetro resultava em diferença significativa na resposta do método analítico, foi realizado o teste *t* de Student, com 95% de significância.

2.6.5 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram estimados com base no desvio padrão da resposta e da inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL, 2005), conforme a equação:

$$LD = 3,3 \frac{\sigma}{S} \text{ e } LQ = 10 \frac{\sigma}{S}$$

Onde:

σ = desvio padrão da resposta

S = inclinação da curva analítica

2.7 Análises estatísticas

Além das análises estatísticas previamente descritas em linearidade, todas as médias e desvios-padrão foram obtidos utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0. As comparações entre as médias, quando necessárias, foram feitas utilizando-se o teste t de Student, por meio do mesmo programa. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seletividade

3.1.1 Seletividade em relação aos excipientes da formulação

A quantificação de substâncias através de métodos analíticos é um processo baseado em dados quantitativos, e por isso, é de extrema importância verificar a qualidade dos resultados com o objetivo de garantir confiabilidade. Ao propor um método analítico inexistente nos compêndios oficiais, sempre é necessário que esse método passe por um conjunto de critérios conhecidos como validação (BRASIL, 2003).

Para o desenvolvimento do método analítico a seletividade é o primeiro parâmetro a ser avaliado. Assim esse parâmetro busca avaliar possíveis interferências dos excipientes na determinação dos teores do fármaco. Os espectros no ultravioleta mostraram um pico máximo de absorção para a solução de AR a $3\mu\text{g/mL}$ em 324 nm e para os componentes dos NE-BR em, 210-230 nm. Na figura 10, observa-se que as bandas de transição eletrônica do espectro da NE-BR não se sobrepõem de modo significativo às do fármaco. Além disso, foi analisada a interferência dos excipientes na absorção do AR em 324 nm, conforme tabela 4. Considerando-se que a porcentagem de interferência foi inferior a 2 %, os excipientes da NE não interferem de modo significativo na quantificação do AR.

Figura 10 – Espectro de absorção da solução de AR e de NE-BR no intervalo dos comprimentos de onda de 200 a 400nm. A seta indica a absorbância do AR em 324 nm.

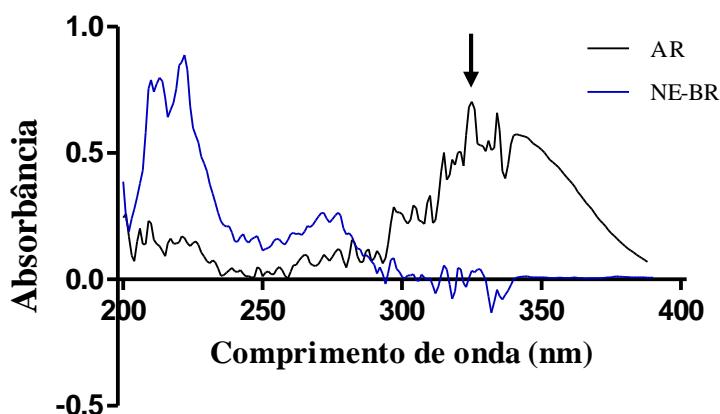


Tabela 4 – Porcentagem de interferência da NE-BR na determinação do AR (concentração: 3,0 µg/mL)

Replicata	Absorbância AR	Absorbância NE-BR	Interferência (%)
1	0,470 ± 0,002	0,0028 ± 0,0002	0,6 ± 0,004
2	0,471 ± 0,005	0,0030 ± 0,0001	0,6 ± 0,003
3	0,474 ± 0,005	0,0029 ± 0,0002	0,6 ± 0,006

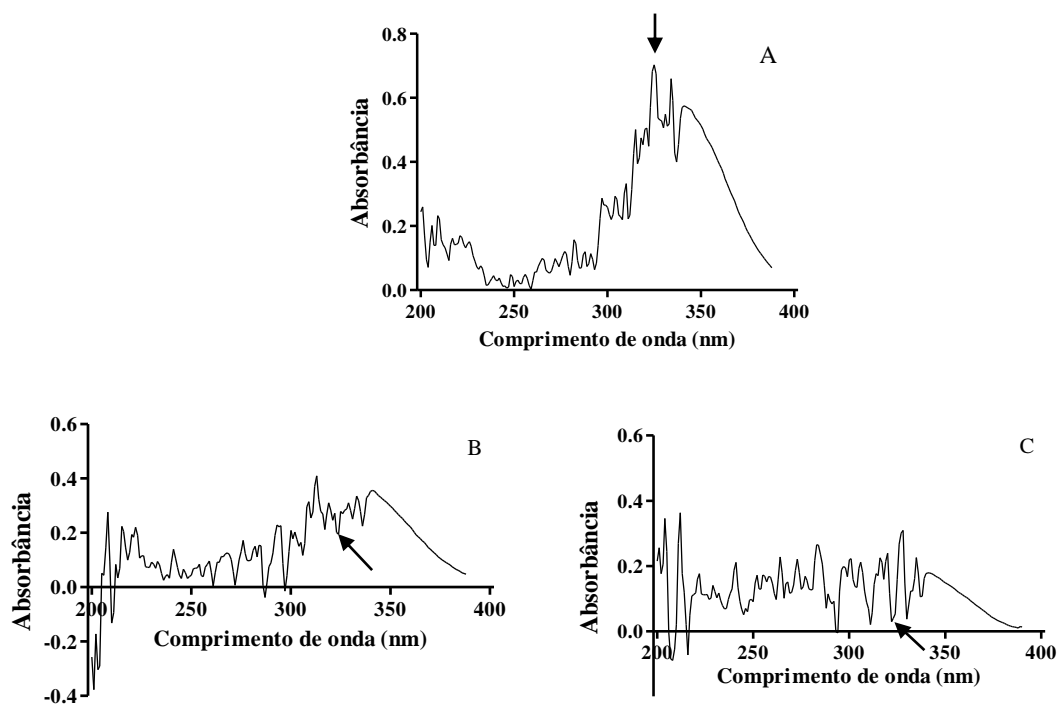
*Dados representados por média ± DP, n = 3.

Dessa forma, o método de espectrofotometria na região do UV pode ser aplicado para a determinação do AR, sem a necessidade de tratamento dos dados, como o uso de derivadas.

3.1.2 Estudo de Degradação Forçada

Os espectros do ultravioleta após exposição do AR à luz solar nos tempos de 10 e 30 minutos estão apresentados na figura 11. Nos gráficos pode-se observar que no comprimento de onda de 324 nm, a absorbância diminuiu proporcionalmente conforme o tempo em que o fármaco ficou exposto à luz solar. BERGOLD *et al.* (2003) também observaram uma degradação intensa, sendo que após 25 minutos de exposição à luz ambiente restaram apenas 25,5% da concentração inicial de AR. Além disso, em uma avaliação da fotoestabilidade do AR, após exposição de 0 a 240 minutos à luz solar, observou-se que a diminuição da absorbância estava relacionada à isomerização do AR para 13 ou 9-cis ácido retinoico (LEOLE *et al.*, 2005).

Figura 11 – Espectros de absorção do AR antes (A) e após exposição a luz solar por 10 e 30 minutos (B e C, respectivamente). A seta indica a absorbância do AR em 324 nm.



O AR também foi exposto a algumas situações de degradação forçada, como a hidrólise ácida, neutra e alcalina, além de oxidação. Os espectros de absorção obtidos encontram-se representados nas figuras 12 e 13, para hidrólise ácida e neutra, respectivamente.

Figura 12 – Espectro de absorção para o AR antes (A) e após a exposição à degradação em meio ácido, nas condições de 5 mL da solução estoque + 5 mL de ácido clorídrico 0,2 M, em tempo 0 (B), 1 hora (C), 2 horas (D), 3 horas (E) e 6 horas (F)

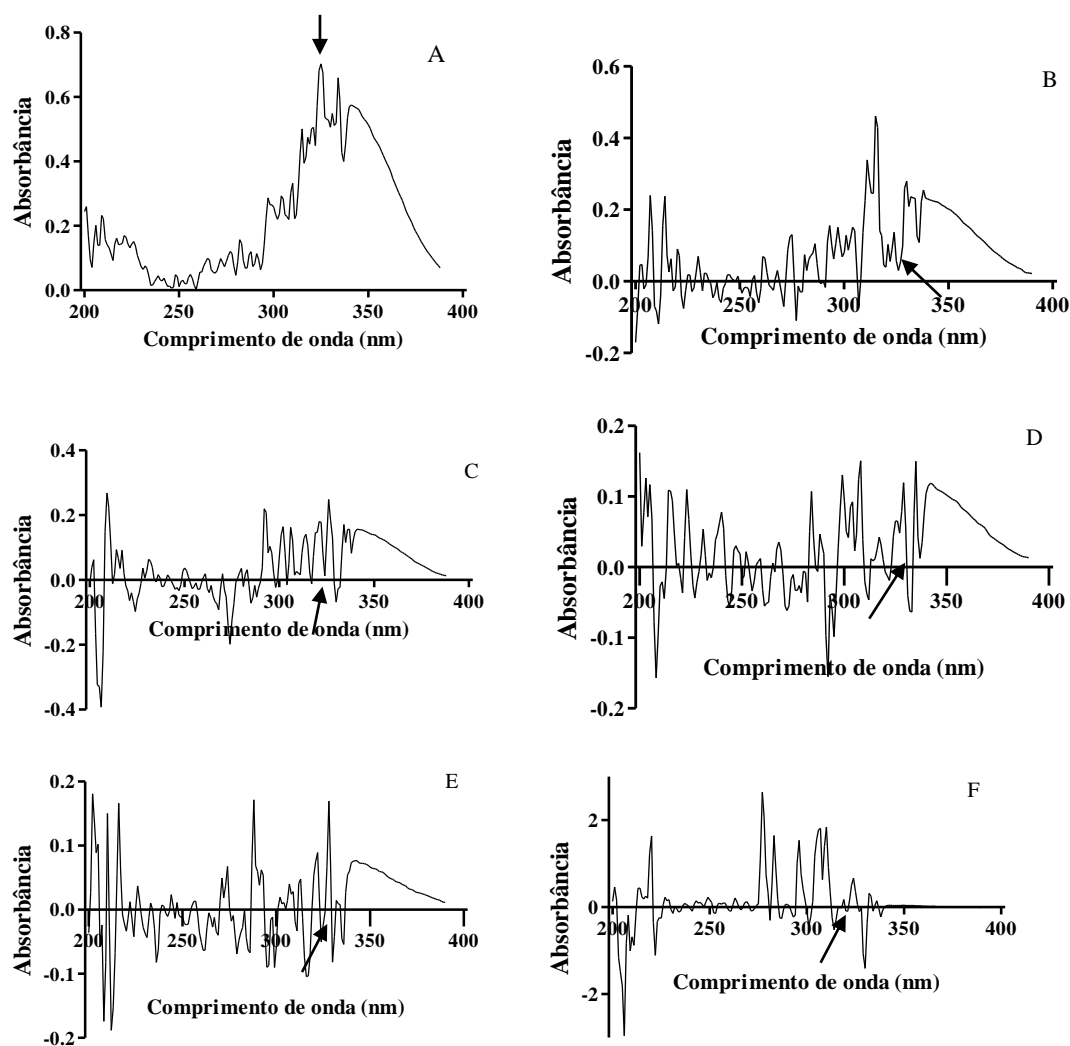
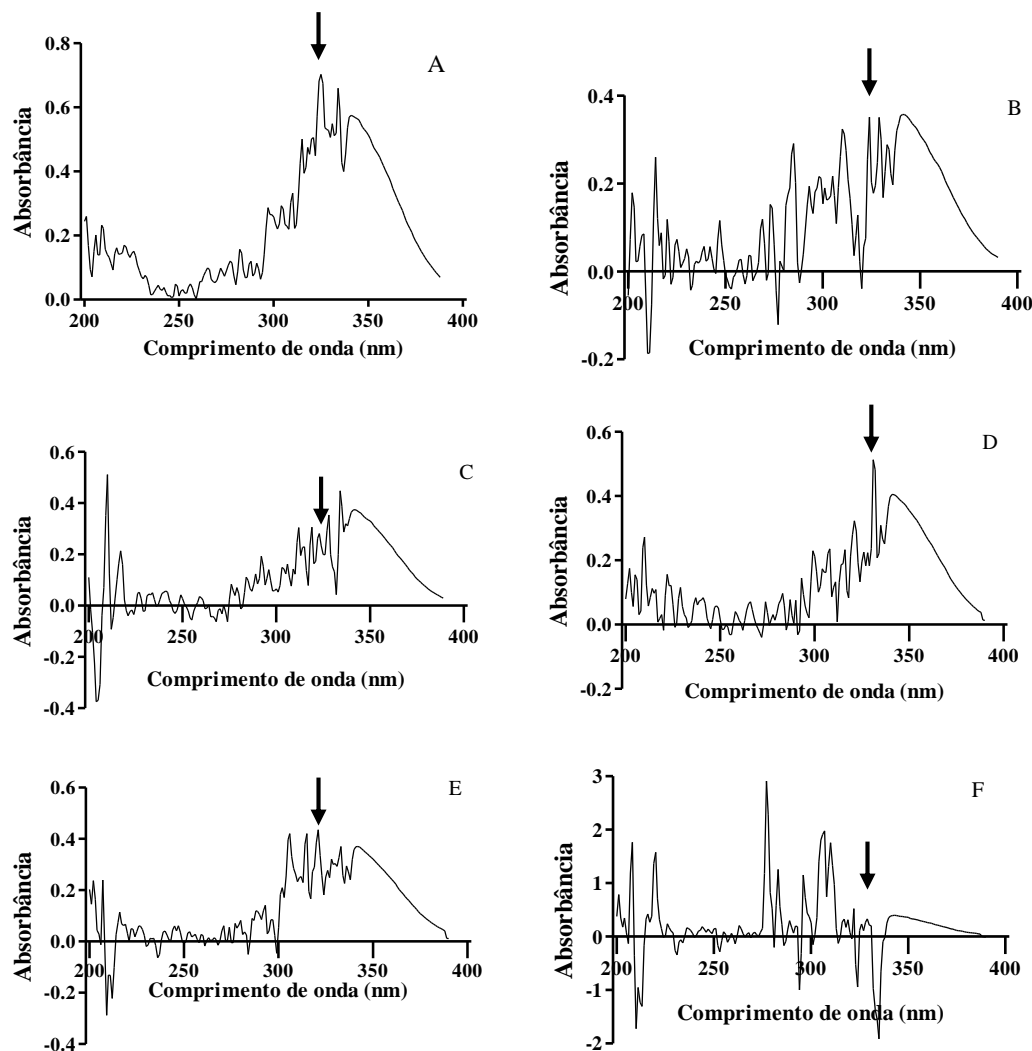


Figura 13 – Espectro de absorção para o AR antes (A) e após a exposição à degradação em meio neutro, nas condições de 5 mL da solução estoque + 5 mL de água ultrapura, em tempo 0 (B), 1 hora (C), 2 horas (D), 3 horas (E) e 6 horas (F).



Observa-se claramente alteração no perfil do gráfico com uma significativa redução na absorbância no comprimento de onda de 324 nm. De fato, a absorbância do AR reduziu de $0,630 \pm 0,006$ (inicial, sem contato com o meio de degradação) para $0,138 \pm 0,00$ e $0,349 \pm 0,10$ após o contato inicial com o meio de degradação ácido e neutro, respectivamente, e para $0,012 \pm 0,01$ e 0 após 6 horas de contato. Após 24 horas de exposição aos meios ácido e neutro, e em relação à hidrólise alcalina e oxidação, não foi possível traçar o espectro de varredura, o que sugere que tenha ocorrido degradação total do fármaco nessas condições.

Considerando que é esperado que o fármaco se degrade nessas condições (GATTI *et al.*, 2000; MANCONI *et al.*, 2003), observa-se que o método também não detecta os produtos de

degradação no mesmo comprimento de onda, uma vez que a absorbância claramente reduziu em função do aumento da degradação do fármaco.

3.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada construindo-se três curvas analíticas para AR em sete níveis de concentração, na faixa de 50% a 150% da concentração de trabalho de AR. Os valores de concentração e as absorbâncias das três curvas, encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações de AR e valores de absorbância para a construção das curvas-padrão.

AR (µg/mL)	Nível de concentração (%)	Replicata	Absorbância	DPR
1,5	50	1	0,230 ± 0,020	0,75
		2	0,232 ± 0,010	0,64
		3	0,235 ± 0,010	0,64
2,0	67	1	0,305 ± 0,005	1,82
		2	0,307 ± 0,003	1,17
		3	0,307 ± 0,006	1,98
2,5	83	1	0,376 ± 0,005	1,40
		2	0,379 ± 0,004	1,06
		3	0,381 ± 0,003	0,99
3,0	100	1	0,485 ± 0,007	1,54
		2	0,488 ± 0,009	1,89
		3	0,486 ± 0,011	2,37
3,5	117	1	0,550 ± 0,004	0,73
		2	0,549 ± 0,002	0,45
		3	0,553 ± 0,002	0,45
4,0	133	1	0,667 ± 0,002	0,39
		2	0,667 ± 0,004	0,60
		3	0,665 ± 0,002	0,43
4,5	150	1	0,767 ± 0,003	0,45
		2	0,768 ± 0,00	0,07
		3	0,770 ± 0,002	0,26

Todas as curvas analíticas independentes, a partir da aplicação do método dos mínimos quadrados ordinários aos dados da tabela 6, obtiveram coeficiente de correlação (r) elevado, (0,9966, 0,9965 e 0,9961) estando de acordo com o preconizado pelas legislações, que estabelece como critério mínimo de aceitação o valor de 0,99 (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL, 2005).

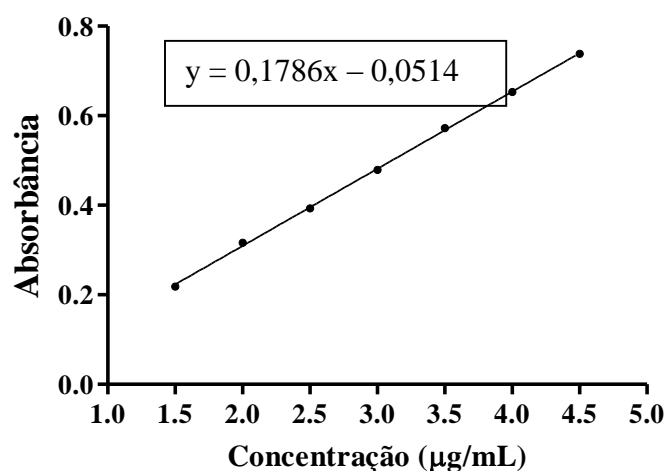
Após análise dos dados individuais, foi construída uma curva consenso entre essas três curvas analíticas (Figura 14). Esta curva consenso também apresentou coeficiente de correlação maior que 0,99, (0,9964) estando de acordo com as legislações da mesma forma (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL, 2005). No entanto, o coeficiente de correlação é inadequado para indicar a falta de ajuste ao modelo linear, não devendo ser utilizado como teste de linearidade (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Assim, foram utilizados outros testes estatísticos, normalidade, homoscedasticidade, significância da regressão e desvio da linearidade ($p < 0,05$) para verificar se os dados atendem a todas as premissas para serem analisados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (Tabela 6). A partir destas análises, foi verificado que os dados se encontram dentro dos parâmetros necessários, sendo válido o tratamento por este método.

O LD obtido neste método foi igual 0,095 $\mu\text{g/mL}$ e LQ foi 0,32 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando a elevada sensibilidade do método. Outros métodos como o de Silva e colaboradores (2015) encontraram valores mais elevados para LD e LQ (1,56 μM e 4,74 μM , respectivamente). Da mesma forma, o método de espectrofotometria derivada proposto por Tehrani e colaboradores (2013) obtiveram como LQ 0,42 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 6 – Análise da regressão linear na construção da curva consenso.

Parâmetros da regressão	Resultados
Inclinação \pm desvio padrão	$0,1786 \pm 0,0019$
Intercepto \pm desvio padrão	$-0,0514 \pm 0,0061$
Coefficiente de Correlação (r^2)	0,9929
Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	1,5 – 4,5
Normalidade ($R_{\text{crítico}}$)	0,981 (0,9603)
Homoscedasticidade ($T_{\text{crítico}}$)	0,678 (0,6728)
Regressão ($F_{\text{crítico}}$)	842,40 (1,5)
Linearidade ($F_{\text{crítico}}$)	0,542 (2,4)
LD ($\mu\text{g/mL}$)	0,095
LQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,320

Figura 14 – Curva analítica consenso construída para o doseamento do AR

3.4 Precisão

A precisão do método para doseamento de AR por espectrofotometria no ultravioleta foi determinada em dois dias consecutivos de análise, obtendo-se valores de precisão intra-dia e inter-dias. Os valores da concentração de AR determinados e DPR (%) em ambos os níveis de precisão estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Análise de precisão intra-dia e inter-dias

Replicata	Concentração de AR (µg/mL)	
	1º Dia	2º Dia
1	2,78	2,84
2	2,98	3,00
3	2,81	2,88
4	2,87	2,89
5	2,84	2,83
6	2,92	2,91
Média (n=6)	2,87	2,89
DPR (intra-dia)	2,57	2,35
Média (n=12)	2,88	
DPR (inter-dias)	2,40	

Os valores de DPR encontrados para cada um dos dois dias nos testes de precisão (2,57 e 2,35 %) e entre ambos os dias (2,40 %) são inferiores ao limite de 5% estabelecido pela legislação (BRASIL, 2003). Desta forma, o método pode ser considerado preciso.

3.5 Exatidão

A avaliação da recuperação do AR foi avaliada utilizando-se uma formulação contendo apenas excipientes. Adicionou-se AR à NE-BR em três níveis de concentração, baixo, médio e alta (67, 100 e 133% da concentração de trabalho), conforme a tabela 8. Os valores de recuperação médios devem se situar entre 98,0 e 102,0% (GREEN, 1996).

Tabela 8—Porcentagens de recuperação de AR na matriz de NE em diferentes níveis de concentração.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Média (µg/mL)	Recuperação média(%)	DPR (%)
2,00	2,00	1,98 ± 0,022	99,0 ± 0,35	1,14
	1,97			
	1,96			
3,00	2,97	2,96 ± 0,008	99,5 ± 0,01	0,28
	2,96			
	2,95			
4,00	3,97	3,96 ± 0,010	99,0 ± 0,01	0,25
	3,95			
	3,96			

Em todos os níveis de concentração a recuperação encontrada se encontra dentro dos limites de 98 a 102%, comprovando a exatidão do método (GREEN, 1996).

3.6 Robustez

A capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos é conhecida como robustez (BRASIL, 2003). A tabela 9 apresenta os resultados de teor obtidos após alteração do fornecedor de metanol e variação na concentração de NaOH para preparar o solvente metanol:NaOH (50:50).

Tabela 9 – Recuperação de AR em NE-AR, variando marca do solvente e concentração de hidróxido de sódio na proporção dos solventes.

Parâmetro	Concentração de AR ($\mu\text{g/mL}$)	Valor P
Metanol:NaOH 0,1M (50:50)	$2,98 \pm 0,05$	-
Fornecedor de metanol	$2,93 \pm 0,12$	$0,013 \pm 0,03$
NaOH 0,01 M	$2,85 \pm 0,11$	$0,023 \pm 0,06$
NaOH 0,001 M	$2,21 \pm 0,35$	$0,001 \pm 0,02$

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando houve variação no uso de metanol obtido a partir de outro fabricante, bem como quando a concentração de NaOH utilizada foi de 0,01 M. E, ainda que seja estatisticamente significativa, houve uma considerável redução na concentração de AR encontrada quando foi utilizado NaOH a 0,001 M, representando 74 % da concentração original. Desta forma, o método não pode ser considerado robusto nas condições avaliadas.

4 CONCLUSÃO PARCIAL

O método proposto por espectrofotometria no ultravioleta é uma alternativa para determinação de AR em NE. O método apresentou linearidade, seletividade, precisão e exatidão adequados para esta quantificação. No entanto, não se apresentou robusto. Assim, o método é considerado válido para a finalidade proposta, sendo de fácil execução, rápido e de baixo custo, podendo ser inclusive uma alternativa à quantificação por CLAE.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÁCIDO RETINOICO REVESTIDAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO

1 INTRODUÇÃO

A quimioterapia tem como objetivo destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais, trazendo diversos efeitos tóxicos inconvenientes.

O AR tem sido amplamente estudado por inibir a proliferação de células cancerosas e apoptose por meio do bloqueio do ciclo celular na fase G₁ (ORTIZ *et al.*, 2002; TANG & GUDAS, 2011). O principal uso do AR é como agente de diferenciação celular para o tratamento da leucemia, em especial, a leucemia promielocítica aguda. No entanto tem sido proposto seu efeito agonista em outros tipos de câncer como melanoma, câncer de pulmão, câncer de rins e câncer de mama (BUSHUE; WAN, 2010; PETRIE *et al.*, 2009).

O AR tem sido incorporado em nanocarreadores como uma alternativa para viabilizar sua administração intravenosa. Contudo, o teor de encapsulação do AR nesses sistemas é normalmente baixo, a menos que a relação tensoativo/lípide utilizada seja alta (LIM & KIM, 2002). Uma alternativa que tem sido utilizada para promover aumento da encapsulação em NLS e CLN é a formação de um par iônico entre o AR e diferentes amins (CASTRO *et al.*, 2009; CARNEIRO, *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016). A encapsulação do AR nestes nanossistemas apresenta as potenciais vantagens de maior eficácia terapêutica, liberação prolongada e direcionamento para um determinado alvo por meio de interação de ligantes na superfície dos glóbulos com receptores da superfície celular.

O AH é um dos agentes de revestimento que tem sido utilizado como para promover o direcionamento ativo para tumores que sobreexpressam o receptor CD44. Considerando a presença da amina catiônica, presente em excesso na formulação, permite que seja realizado um revestimento por atração eletrostática com o AH, negativamente carregado. As principais vantagens desses nanossistemas revestidos com AH utilizados como quimioterápicos é o aumento do tempo de permanência na corrente sanguínea e o aumento da especificidade ao tumor (RIVKIN *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2012). Dessa forma, o desenvolvimento de NE carregadas com um par iônico entre SA e AR, revestidas com AH por atração eletrostática pode ser uma alternativa interessante para aumentar a atividade anticâncer *in vitro* contra células de câncer de mama e reduzir sua toxicidade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

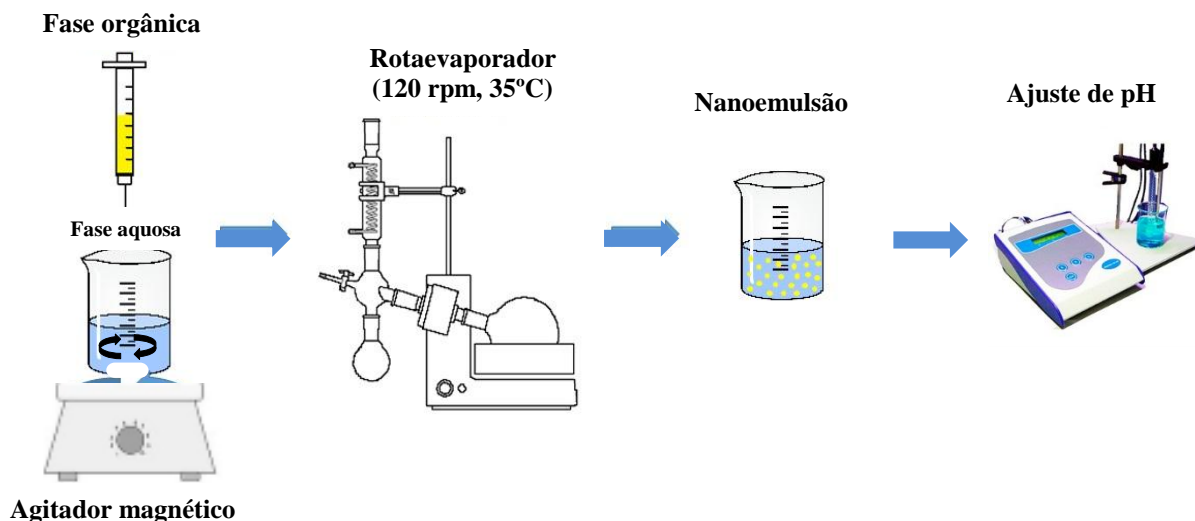
O ácido retinoico *todo-trans* foi fornecido pela BASF (Ludwigshafen, Alemanha). Estearilamina (SA) e colesterol foram obtidos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, EUA). Mono-oleato de sorbitano etoxilado de grau super refinado (Polissorbato 80; SuperRefined Tween80®) e Crodamol® GTCC (triglicérides do ácido cáprico e caprílico) foram cedidos pela Croda Inc (Edison, EUA). Lecitina de ovo (Lipoid® E-80) foi fornecida pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O ácido hialurônico (350 kDa) foi obtido da All Chemistry (São Paulo, Brasil). O metanol e o álcool isopropílico foram fornecidos pela ISO FAR (Rio de Janeiro). O etanol e o ácido clorídrico (HCl) foram obtidos pela ProQuímios (Rio de Janeiro, Brasil).

Para os estudos de citotoxicidade *in vitro*, o meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) e RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). O soro fetal bovino (SFB), metiltiazoltetrazólio [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio (MTT)], estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL foram adquiridos pela Gibco® Life Technologies (Carlsbad, EUA). As linhagens celulares MCF-7 (adenocarcinoma mamário), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário) e foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, EUA) e L929 (fibroblastos) foi adquirida da Prof. Dra. Helen Rodrigues Martins. Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Preparação de NE

As NE foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea (Figura 15). Primeiramente, a fase oleosa (FO) e a fase aquosa (FA) foram pesadas separadamente e em seguida a FO foi solubilizada no solvente orgânico. Verteu-se por gotejamento a FO na FA, com o auxílio de uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de 25 mm x 0,7 mm, sob agitação magnética constante a 300 rpm por 10 minutos. Removeu-se completamente o solvente orgânico com o auxílio de um evaporador rotatório (Fisatom 803, São Paulo, Brasil) a pressão reduzida de -500 a -600 mmHg, com rotação de 120 rpm, em 35 °C. O pH das formulações foi ajustado para 7,0 com HCl ou NaOH 0,1 M, utilizando um pHmetro (MS TecnoPON® mPA 210, Piracicaba, Brasil).

Figura 15 – Representação esquemática do preparo das NE pelo método de emulsificação espontânea.



2.2.1 Desenvolvimento das nanoemulsão sem revestimento

No desenvolvimento das formulações, primeiramente foi feita a otimização da base lipídica sem fármaco. Posteriormente, foi realizada a incorporação do AR no sistema otimizado e, em seguida, o revestimento com AH.

Inicialmente, a NE foi composta pelo Crodamol™ GTCC (triglicérides de cadeia média – TCM) como matriz oleosa, Tween80® (emulsificante), SA (amina catiônica), colesterol (cotensoativo) e glicerol (isotonizante), cujas quantidades estão apresentadas na tabela 10. A influência dos parâmetros de preparação sobre o diâmetro médio dos glóbulos, índice de polidispersão (IP) e o potencial zeta foi avaliada e utilizada como parâmetro de escolha da formulação a ser utilizada.

Tabela 10 – Composição das NE (% p/v).

Componente	NE 1	NE 2	NE 3	NE 4
Fase oleosa				
TCM	1,5	1,5	1,5	1,5
Colesterol	0,15	0,15	-	-
AS	0,1	0,1	0,1	0,1
Tween® 80	-	-	-	-
Lecitina	-	0,5	0,5	0,5
Fase aquosa				
Glicerol	2,25	2,25	2,25	2,25
Tween® 80	1,0	0,5	0,5	0,5
Água qsp	100	100	100	100

TCM = triglicerídeos de cadeia média; SA = estearilamina

Primeiramente, avaliou-se o Tween® 80 como tensoativo único, adicionado na FA (NE 1). Em seguida, adicionou-se a lecitina como um segundo tensoativo na FO, mantendo o Tween® 80 na FA e a presença de colesterol como cotensoativo (NE 2). Posteriormente, retirou-se o colesterol (NE 3) e, por fim, a influência do solvente orgânico foi investigada, substituindo-se o etanol por acetona (NE 4).

Após a otimização da composição da formulação, decidiu-se otimizar o procedimento de preparo das NE. Dessa forma, alterou-se alguns parâmetros críticos no procedimento como velocidade de agitação e a forma de adição da fase oleosa (Tabela 11). No preparo da NE 5 elevou-se a velocidade de rotação de 300 rpm (NE 4, originalmente) para 750 rpm. A segunda variação foi a adição da fase orgânica em jato, mantendo a agitação magnética em 750 rpm (NE 6). Por último, incluiu-se uma etapa de sonicação, submetendo-se a melhor formulação obtida ao banho de ultrassom (Unique USC 1400, São Paulo, Brasil) por 10 minutos antes da etapa de evaporação do solvente (NE 7). Por fim, incorporou-se o AR à formulação escolhida na concentração de 0,05%.

Tabela 11 – Parâmetros de processo otimizados no preparo das NE.

Parâmetro	NE 4	NE 5	NE 6	NE 7
Velocidade de agitação (rpm)	300	750	750	750
Adição FO	Gotejamento	Gotejamento	Em jato	Em jato
Ultrassom	-	-	-	10 min

2.2.2 Revestimento das Nanoemulsões com Ácido Hialurônico

As NE contendo AR revestidas com AH (NE-AR-AH) foram preparadas pelo método de atração eletrostática (Figura 16) (YANG *et al.*, 2013). Inicialmente, adicionou-se lentamente 1 mL de dispersão de NE contendo AR (NE-AR), a 1 mL de solução de AH, sob agitação magnética vigorosa a 750 rpm, por 10 minutos. Foram investigadas as seguintes concentrações de AH: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/mL.

Figura 16 – Representação esquemática do revestimento das NE por atração eletrostática

2.3 Caracterização das nanoemulsões

2.3.1 Determinação do diâmetro médio dos glóbulos das NE

O diâmetro médio dos glóbulos foi determinado por espalhamento dinâmico da luz (EDL), utilizando-se o Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Inglaterra), em ângulo fixo de

90° e temperatura de 25 °C. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, sendo cada replicata correspondente à média de doze medidas. Os resultados foram fornecidos como diâmetro efetivo (diâmetro médio avaliado pela intensidade) e índice de polidispersão (IP). O valor máximo aceitável para considerar a amostra monodispersa foi de IP igual ou inferior a 0,3.

2.3.2 Determinação do potencial zeta dos glóbulos das NE

O potencial zeta foi determinado pela análise da mobilidade eletroforética dos glóbulos e do EDL. As leituras foram realizadas empregando-se o Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Inglaterra), em ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

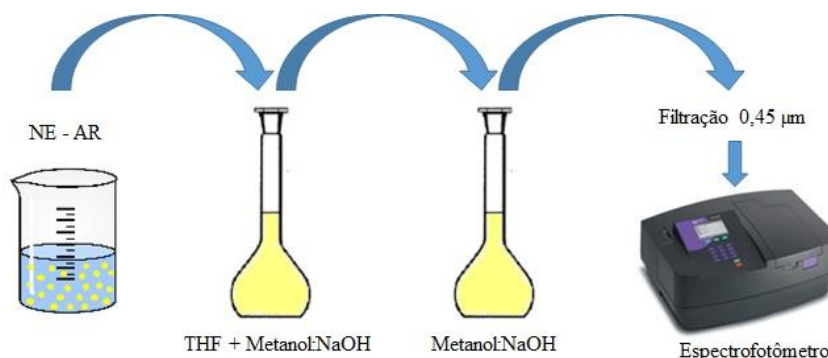
2.3.3 Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de infravermelho foram realizadas utilizando o espectrômetro Smart Omni-Sampler da Termo Scientific, a partir de amostras depositadas diretamente em placas de KBr. Os espectros foram obtidos no intervalo de 400 a 4000 cm⁻¹.

2.3.4 Determinação do teor de encapsulação do AR

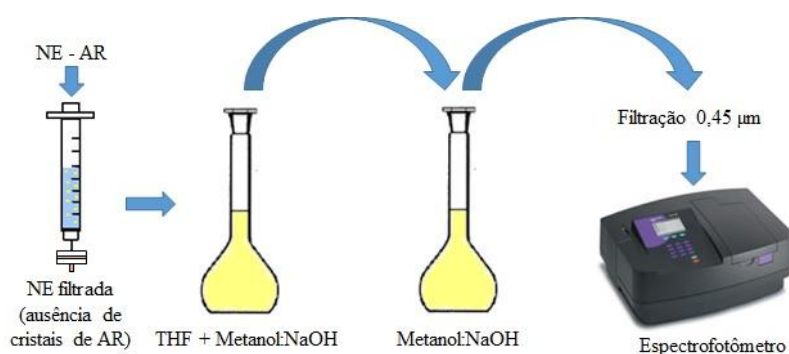
Para a análise do teor de AR antes da filtração (AR total), transferiu-se 120 µL da NE-AR para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, adicionou-se 300 µL de THF e completou-se o volume do balão com uma mistura de metanol e NaOH 0,1 M (50:50), obtendo-se uma solução de concentração 6 µg/mL. Transferiu-se 5 mL da solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol:NaOH 0,1 M (50:50), resultando em uma solução de concentração 3 µg/mL. Esta solução foi então filtrada em membrana de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore, Billerica, EUA) e analisada por espectrofotometria UV/Vis em 324 nm (Figura 17).

Figura 17 – Esquema da determinação da concentração total do AR.



Para a análise do AR após a filtração (AR encapsulado), realizou-se a filtração da NE em membrana não estéril de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore, Billerica, EUA) para a remoção dos cristais de AR não encapsulados. Em seguida, 120 µL do filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 300 µL de THF e completou-se o volume do balão com metanol:NaOH 0,1 M (50:50), obtendo-se uma solução de concentração 6 µg/mL. Transferiu-se 5 mL da solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol:NaOH 0,1 M (50:50), resultando em uma solução de concentração 3 µg/mL. Esta solução foi então filtrada em membrana de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore, Billerica, EUA) e analisada por espectrofotometria UV/Vis em 324 nm (Figura 18).

Figura 18– Esquema da determinação da concentração do AR filtrado



O teor de encapsulação foi calculado pela fórmula:

$$TE (\%) = \frac{\text{AR Filtrado}}{\text{AR Total}} \times 100$$

2.3.6 Microscopia de Luz Polarizada

A presença de cristais de AR na fase externa das NE-AR e NE-AR-AH foi avaliada utilizando um microscópio óptico com luz polarizada (Zeiss – Axio Imager.M2, Carl Zeiss Microscopy S. L., Oberkochen, Alemanha). As amostras foram aplicadas diretamente em lâminas de vidro e avaliadas utilizando-se o software Zen Pro 2012 (Carl Zeiss Microscopy S. L., Oberkochen, Alemanha). O microscópio foi equipado com câmera digital AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss Microscopy S. L., Oberkochen, Alemanha).

2.4 Estudo de estabilidade preliminar das NE

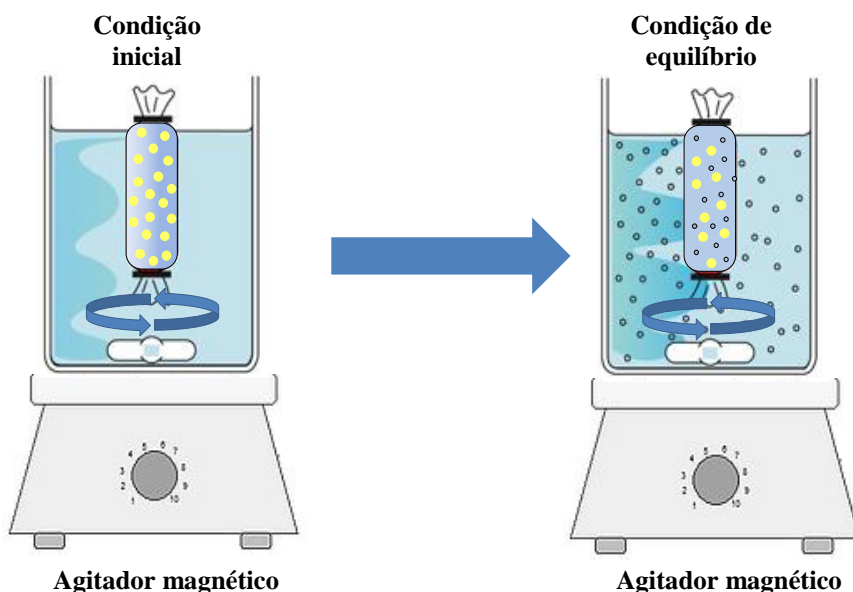
Para o estudo de estabilidade foram preparados três lotes das formulações NE-AR e NE-AR-AH. Os lotes foram armazenados em frascos de penicilina protegidos da luz e conservados em temperatura de 4°C. Em intervalos regulares de 0, 7, 15, 30, 60 dias, uma alíquota foi retirada e avaliaram-se os seguintes parâmetros: tamanho, IP, potencial zeta, pH e teor de AR encapsulado.

2.5 Estudos *in vitro*

2.5.1 Avaliação da cinética de liberação

O estudo de liberação foi executado pelo método de diálise, conforme representado na figura 19 (HU *et al.*, 2004; CHINSRIWONGKUT *et al.*, 2011). As membranas de diálise (*cut-off* de 14 kDa, Sigma-Aldrich, EUA) foram previamente cortadas em tamanho aproximado de 6 cm e ativadas por meio de submersão em 400 mL de água Milli Q aquecida a 80 °C, sendo mantidas sob agitação magnética durante 30 minutos. Este procedimento foi realizado em quatro ciclos de lavagem.

Figura 19 –Representação esquemática do estudo de liberação das formulações pelo método de diálise.



Na execução do ensaio, foram adicionados 2,0 mL de NE-AR, NE-AR-AH e AR livre para cada membrana de diálise, que foram inseridas em frascos âmbar contendo 50,0 mL de meio de liberação composto por tampão fosfato-salina (PBS) pH7,4, etanol absoluto e Tween®80 (88:10:2), sob agitação magnética constante a 37 °C. Em diferentes tempos pré-determinados 0, 30 minutos, 1, 2, 4, 8 e 24 horas, 1 mL de meio foi coletado e a mesma quantidade foi reposta.

Os dados obtidos dos perfis de liberação de NE-AR, NE-AR-AH e AR livre, foram submetidos a tratamentos matemáticos para a determinação da cinética de liberação/dissolução, sendo propostos os seguintes modelos matemáticos (COSTA e SOUZA, 2001; RODRIGUES e SILVA, 2005):

- Cinética de ordem zero: foram construídos gráficos de tempo (t) versus quantidade não liberada do fármaco (QNL).
- Cinética de primeira ordem: foram construídos gráficos de tempo (t) versus logaritmo da porcentagem de fármaco não liberada ($\log \%NL$).
- Modelo de Higuchi: foram construídos gráficos da raiz quadrada do tempo (\sqrt{t}) versus a porcentagem liberada ($\%L$).
- Korsmeyer-Peppas: foram construídos gráficos de logaritmo do tempo ($\log t$) versus log da porcentagem de fármaco não liberada ($\log \%NL$).

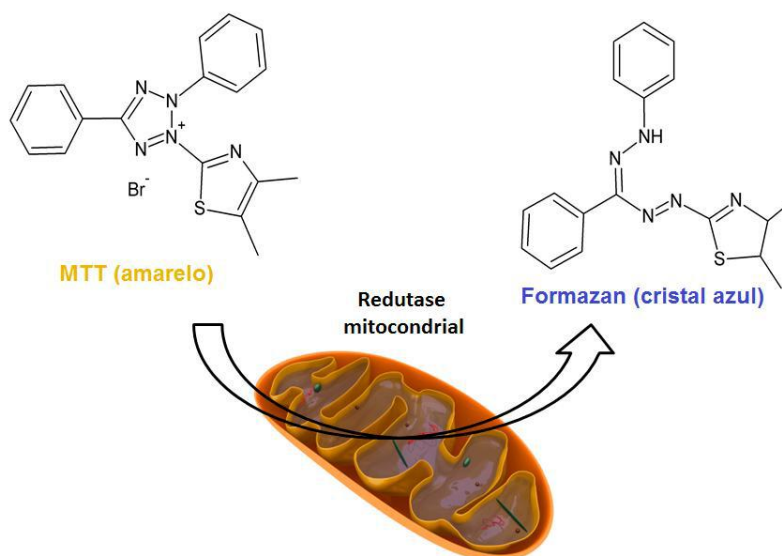
2.5.2 Cultivo das linhagens celulares

Os estudos de atividade *in vitro* foram conduzidos utilizando as linhagens de células normais, L929 (fibroblastos de rato), e neoplásicas, MCF-7 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano). As células L929 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em DMEM. Os meios de cultivo foram suplementados com 10% de SFB e os antibióticos estreptomicina a 100 µg/mL e penicilina a 100 UI/mL. As culturas de células foram mantidas em garrafas T-75 em uma estufa umidificada em ambiente de 5% de gás carbônico (CO₂) em 37 °C.

2.5.3 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de metabolização de metiltiazoltetrazólio (MTT)

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de metabolização do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), que é baseado na redução do sal de tetrazólio (amarelo) pela atividade metabólica mitocondrial formando cristais de formazan (azuis), conforme mostrado na figura 20 (MOSMANN, 1983).

Figura 20 – Reação de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT, amarelo) a cristais de formazan (azuis) pela redutase mitocondrial de células viáveis (CARNEIRO et al., 2013).



Assim, alíquotas das células em suspensão MDA-MB-231 ($2,0 \times 10^4$ células/mL), MCF-7 ($2,5 \times 10^4$ células/mL) ou L929 ($1,0 \times 10^5$ células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas em 37 °C e 5% de CO₂ para permitir a adaptação antes da adição das formulações testadas.

Após a incubação, 20 µL das soluções recentemente preparadas do AR livre ou encapsulado nas NE foram adicionadas aos poços (concentração na faixa de 1,56 µM a 100 µM). O AR livre foi dissolvido em etanol absoluto (4 mM) antes da diluição. As NE branco, sem AR, revestidas ou não, foram diluídas da mesma forma que as NE contendo AR encapsulado. Após 48 horas de incubação em atmosfera de 5% de CO₂ e em 37 °C, adicionou-se 20 µL de solução de MTT a 5 mg/mL a cada poço e as placas foram novamente incubadas nas mesmas condições já citadas, por 4 h. Decorrido esse tempo, o meio foi removido e substituído por 200 µL de ácido clorídrico 0,04 M em isopropanol.

A viabilidade celular foi avaliada pela medida da taxa de redução mitocondrial do MTT em cada tratamento, determinada através das leituras de absorbância no comprimento de onda de 595 nm, e comparada às células mantidas no meio sem tratamento (100 % da viabilidade). Os grupos controle incluíram tratamento com etanol absoluto (controle negativo) e AR (controle positivo), sendo que a viabilidade celular foi de 100% após tratamento com o solvente enquanto o AR foi efetivo em promover inibição da proliferação celular. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle. Foram realizados 3 experimentos independentes, avaliados em sextuplicatas. Determinou-se assim, a concentração de AR necessária para promover 50% de inibição na viabilidade das células tumorais (IC₅₀) e das células normais (CC₅₀).

2.5 Análises Estatísticas

Os valores médios e os desvios-padrão (DP) foram calculados para todos os experimentos descritos anteriormente. A análise estatística foi feita por meio de análise de variância one-way (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Um modelo de regressão não-linear foi utilizado para determinar os valores de IC₅₀. Para todas as análises foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0*. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento e caracterização das NE

O principal objetivo deste trabalho foi a incorporação do AR em NE revestidas com AH e a avaliação de sua atividade antineoplásica *in vitro*. O AH foi utilizado para promover o direcionamento ativo das NE às células que sobreexpressam o receptor CD44, como algumas linhagens de células tumorais.

A primeira etapa do desenvolvimento farmacotécnico das NE foi a otimização da composição (NE 1 a 4). O desenvolvimento de formulações consiste na avaliação da influência da composição e do método de preparo sobre as características das NE, particularmente no tamanho dos glóbulos. Em sistemas nanoestruturados desenvolvidos para administração intravenosa, esse parâmetro físico-químico é de extrema importância para determinar a melhor formulação e, desta forma, foi utilizado como critério de escolha. A presença de gotas de micrométricas aumenta o risco de embolia e aumenta a instabilidade do NE, que se manifesta pela fusão dos glóbulos. Assim, NE com glóbulos monodispersas com tamanho em torno de 200-500 nm tendem a ser mais estáveis e mais seguras, uma vez que vasos capilares menores possuem em média 5µm de diâmetro (HANS & LOWMAN, 2002; HIPPALGAONKAR *et al.*, 2010).

Inicialmente, foi otimizada a formulação da NE branca, sem fármaco e sem revestimento. Os parâmetros físico-químicos das NE 1 a 4, tais como o diâmetro médio, IP e potencial zeta, estão dispostos na tabela 12.

Tabela 12 – Caracterização das NE otimizadas quanto a composição.

NE	Parâmetro	Tamanho (nm)	IP	Potencial Zeta (ζ) (mV)
1	Composição inicial	422 ± 9	0,18 ± 0,006	(+) 10,8 ± 1,3
2	Combinação Lecitina + Tween®80	346 ± 15	0,22 ± 0,007	(+) 30,4 ± 0,8
3	Sem colesterol	280 ± 1	0,19 ± 0,003	(+) 29,9 ± 1,1
4	Acetona como solvente	424 ± 14	0,42 ± 0,049	(+) 36,1 ± 1,1

*Dados representados por média ± DP, n = 3.

O primeiro parâmetro avaliado foi a influência da utilização de um único tensoativo ou de uma combinação de tensoativos. A composição inicial foi baseada em trabalhos prévios de Carneiro e colaboradores (2012), contendo Tween[®] 80 na FA levou à formação de uma NE com tamanho na escala nanométrica (NE 1; 422 ± 9 nm). Entretanto, este tamanho ainda foi considerado relativamente grande para a finalidade pretendida, a administração intravenosa voltada para o tratamento do câncer, o que levou a alterações posteriores.

Em seguida, considerando que a associação de um tensoativo lipofílico com outro hidrofílico pode gerar redução no tamanho dos glóbulos de sistemas emulsificados (BRUXEL *et al.*, 2012), adicionou-se a lecitina na composição da NE 1, o que levou à redução de tamanho (NE 2; 346 ± 15 nm). O próximo passo foi avaliar a real necessidade da presença de colesterol, um co-tensoativo proposto desde a composição inicial. Ao se remover o colesterol da formulação, obteve-se um tamanho ainda menor (NE 3; 280 ± 1 nm). Assim, a combinação de dois agentes tensoativos, lecitina (mais lipofílico, EHL = 8,0) e o TWEEN 80[®] (mais hidrofílico, EHL = 15,0), sem a presença de um co-tensoativo, resultou numa formulação com glóbulos menores e monodispersos. De fato, a combinação de fosfolípides com agentes tensoativos não iônicos, como os polissorbatos, em NE têm se mostrado mais estáveis, devido a formação de filmes tensoativos mais compactos, diminuindo assim a ocorrência de cremagem (WANG, *et al.* 2009). Além disso, Wang e colaboradores (2008) também relataram que a adição de colesterol na formulação faz com que haja um aumento significativo de tamanho dos glóbulos além de não serem estáveis devido ao seu caráter altamente lipofílico.

Sabe-se que o tamanho dos glóbulos e IP das NE são fortemente afetados pela natureza do solvente utilizado durante o processo (Bouchemal *et al.*, 2004). Assim, o etanol foi substituído por acetona (NE 4; 424 ± 14 nm e IP $0,42 \pm 0,049$), mas diante do aumento considerável tanto do tamanho quanto do IP, manteve-se o etanol como solvente. Desta forma, a formulação escolhida após a otimização da base lipídica foi a NE 3, com a combinação de tensoativos, sem colesterol e utilizando etanol como solvente.

Todas as formulações avaliadas nesta etapa inicial apresentaram-se monodispersas, à exceção da NE 4, que utilizou acetona como solvente de preparo. Além disso, o potencial zeta de todas as formulações foi positivo, estando associado à presença da SA, uma amina catiônica, na composição das NE. Esta carga altamente positiva (acima de 25-30 mV) é útil para evitar os fenômenos de agregação e coalescência (MOHANRAJ E CHEN, 2006; HIPPALGAONKAR *et al.*, 2010; MARTINI *et al.*, 2007).

Com o intuito de tentar reduzir ainda mais o tamanho dos glóbulos, buscou-se otimizar o procedimento de preparo (Tabela 13) por meio da variação de alguns parâmetros. A primeira

alteração foi o aumento da velocidade da agitação magnética de 300 rpm (NE 3, Tabela 13) para 750 rpm (NE 5), que trouxe uma diminuição discreta de tamanho de 280 ± 1 nm (NE 3) para 268 ± 2 nm (NE 5). Na sequência, a adição em jato da FO na FA (NE 6, 211 ± 5 nm) resultou em uma redução mais significativa, possivelmente por provocar uma maior turbulência interfacial.

Tabela 13 – Caracterização das NE otimizadas quanto ao procedimento de preparo.

NE	Parâmetro	Tamanho (nm)	IP	Zeta (mV)
3	Composição inicial otimizada	280 ± 1	$0,19 \pm 0,003$	(+) $29,9 \pm 1,1$
5	Agitação magnética a 750 rpm	268 ± 2	$0,12 \pm 0,021$	(+) $40 \pm 0,4$
6	Adição da fase orgânica em jato	211 ± 5	$0,14 \pm 0,007$	(+) $32 \pm 1,9$
7	Sonicação por 10 min	135 ± 2	$0,17 \pm 0,016$	(+) $41 \pm 1,2$

*Dados representados por média \pm DP, n = 3.

Manteve-se assim o procedimento de preparo da NE 6 e, antes de evaporar o solvente em pressão reduzida, submeteu-se a formulação a banho de ultrassom por 10 minutos (NE 7, 135 ± 2 nm), o que promoveu consideravelmente a redução do tamanho. A sonicação é muito utilizada nas preparações de NE, pois seu princípio consiste no emprego de um banho de ultrassom que produz ondas interfaciais que são capazes de romper as gotículas da emulsão em gotículas de tamanho nanométrico (KENTISH *et al.*, 2008). Além disso, a emulsificação espontânea é causada por um gradiente de tensão interfacial devido a distribuição não uniforme das moléculas do tensoativo ao longo da interface. O aumento da turbulência interfacial levaria a um espalhamento violento das moléculas do tensoativo na interface. Ao adicionar a FO em jato, fios desta fase são lançadas na FA, onde se desintegram em gotas. As gotículas formadas são estabilizadas pelo tensoativo tornando a emulsão estável (LÓPEZ-MONTILLA *et al.*, 2002).

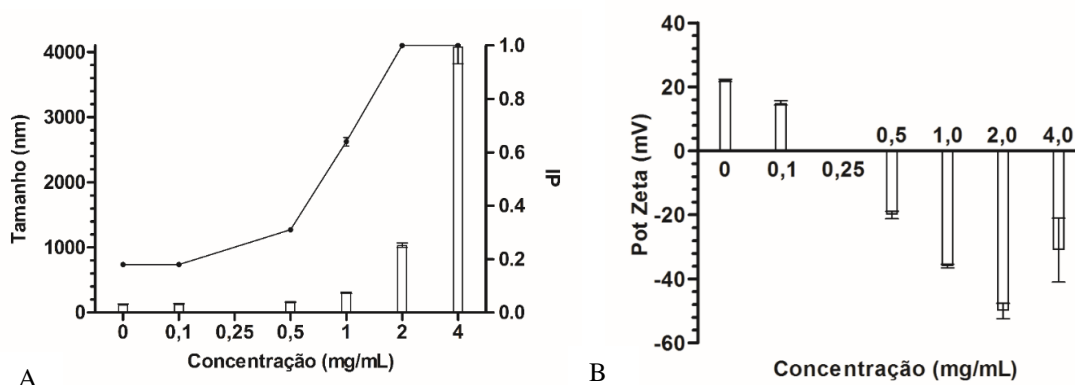
Nota-se que o potencial zeta nas NE manteve-se positivo. Esta carga é devido a presença de SA, um lipídeo catiônico que confere carga global positiva aos glóbulos. Além disso, as NE se mantiveram monodispersas, com IP menor que 0,3. Portanto, a formulação escolhida para dar continuidade nos estudos de desenvolvimento farmacotécnico foi a NE 7, com a sonicação por 10 minutos.

Por fim, foi incorporado AR na concentração de 0,05% na NE 7 otimizada. Esta formulação, denominada NE-AR, apresentou tamanho de 129 ± 2 nm, distribuição monodispersa ($IP 0,18 \pm 0,005$), com potencial zeta de $(+) 35,7 \pm 1,0$ mV. Conforme esperado, um elevado TE foi obtido ($96,7 \pm 4,9\%$), da mesma forma que outros trabalhos anteriores envolvendo a formação de um par iônico entre AR e aminas lipofílicas (CASTRO et al., 2009; CARNEIRO et al., 2012; SILVA, et al., 2015). Portanto, esta formulação foi considerada adequada para ser utilizada no processo de revestimento.

3.2 Revestimentos das NE com AH

Para determinar a concentração de AH adequada para ser utilizada no processo de revestimento da NE, seis concentrações de AH foram utilizadas (0,10 a 4,0 mg/mL). Como pode ser observado na figura 21A, o diâmetro médio dos glóbulos e o IP aumentam conforme o aumento na concentração de AH usada no processo de revestimento. Além disso, conforme o aumento do AH adicionado, foi observada uma diminuição progressiva no potencial zeta (Figura 21B), o que pode ser um indicativo de que o processo de revestimento foi bem-sucedido. Esse fato pode ser explicado pela adição de ânions de AH na parte externa do glóbulo da NE. A fim de que o revestimento com AH ocorra, a carga positiva obtida era particularmente interessante para permitir a interação eletrostática. Considerando-se que o pH durante o processo de revestimento foi 7,0, que o AH neste pH está em sua forma ionizada ($pK_a 3,0$) e que se tem um excesso de SA na formulação (isto é, SA não formando par iônico com AR), a ocorrência de interação eletrostática é favorecida (YANG *et al.*, 2013; TRAN *et al.*, 2015).

Figura 21 – Influência da concentração de AH tanto no diâmetro médio dos glóbulos (barra) e IP (linha) (A), quanto no potencial zeta (B) das NE-AR.

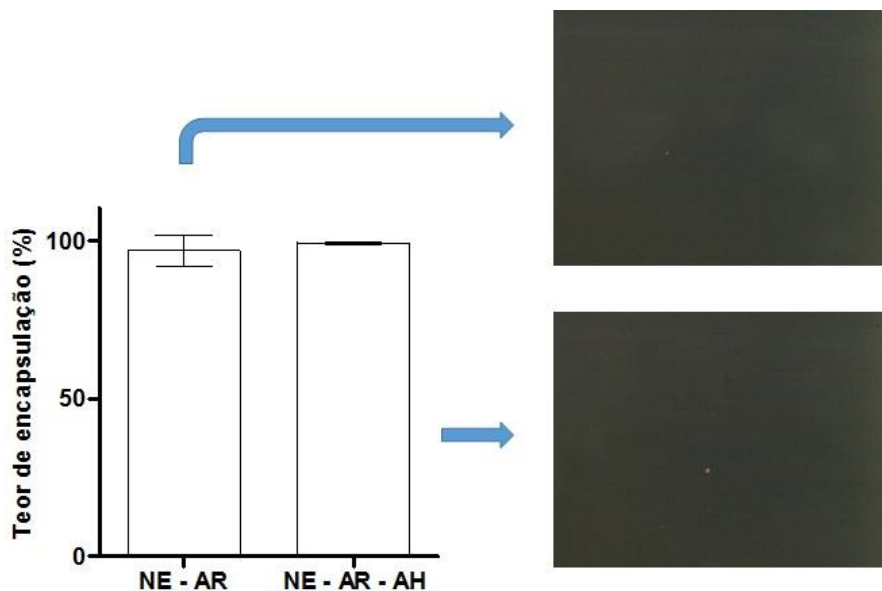


Não foi possível determinar as características físico-químicas da NE-AR-AH com a concentração de 0,25 mg/mL de revestimento de AH, uma vez que foi observada aglomeração. Esta aglomeração pode estar associada à neutralização das cargas positivas da SA com o AH aniônico, sendo que nesta concentração o sistema apresenta carga elétrica líquida igual a zero. Desta forma, a etapa crítica no revestimento por atração eletrostática é a inversão do potencial zeta do nanossistema, visto que esta aglomeração também pode ocorrer em torno do ponto isoelétrico do AH, que é 6,0 (ALMALIK *et al.*, 2013).

A formulação considerada adequada para ser utilizada nos estudos subsequentes foi a de 0,5 mg/mL, que apresentou o menor tamanho (158 ± 5 nm) após a inversão do potencial zeta ($-19,7 \pm 1,20$ mV). O potencial zeta negativo é importante ser alcançado pois uma elevada carga positiva no nanossistema também tem sido associada à citotoxicidade contra células cancerosas e normais (CARNEIRO *et al.*, 2012). Esta formulação revestida por AH a 0,5 mg/mL foi então denominada NE-AR-AH.

Além disso, o AR manteve a elevada encapsulação na NE-AR-AH ($99,2 \pm 0,5\%$). A presença de cristais de AR insolúveis na fase aquosa externa da NE-AR e NE-AR-AH foi avaliada por microscopia de luz polarizada. Há praticamente ausência de cristais em ambas NE (Figura 22), o que está de acordo com os elevados valores de TE encontrados para estas formulações. O elevado TE está associado à formação de um par iônico entre o AR e uma amina lipofílica, o que também tem sido observado em estudos anteriores do nosso grupo, em que foi demonstrado que a interação e a retenção de AR na matriz lipídica aumentam com a hidrofobicidade dos contra-íons utilizados (CASTRO *et al.*, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2012).

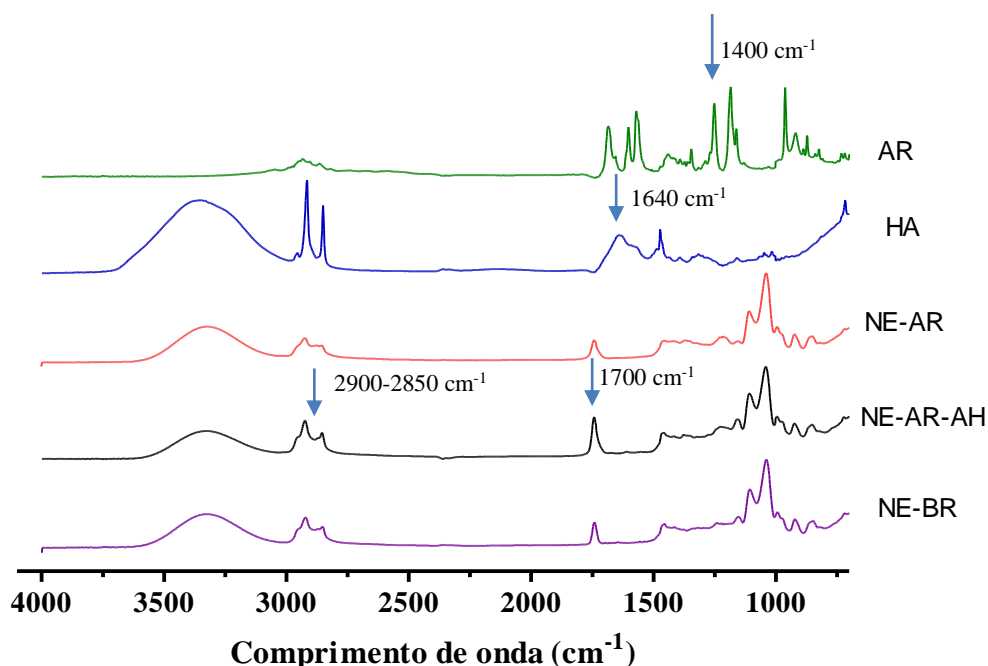
Figura 22 – Teor de encapsulação e microscopia de luz polarizada da NE-AR e NE-AR-AH.



3.3 Análise por infravermelho

Para confirmar o revestimento da NE-AR com AH foi traçado os espectros de FTIR da NE-AR e NE-AR-AH (Figura 23). Observa-se no AH uma banda no comprimento de onda 1640 cm^{-1} , referente a $\text{C}=\text{O}$ presente no AH. No espectro NE-AR-AH há presença de uma banda em 1700 cm^{-1} , que é característico de grupos carboxílicos ionizáveis (TOOLE *et al.*, 1997). Assim, tem-se mais uma evidência de que o revestimento das NE ocorreu por atração eletrostática entre a função amina da SA em excesso e o grupo carboxílico do AH (YANG *et al.*, 2013; TRAN *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2014). Além disso, o espectro da NE-AR-AH apresenta uma banda nos comprimentos de onda 2850 e 2900 cm^{-1} , sugerindo a inserção de AH no sistema, pois estas bandas são características de C-H (Figura 23).

Figura 23 – Espectros de infravermelho na faixa de $4000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$.

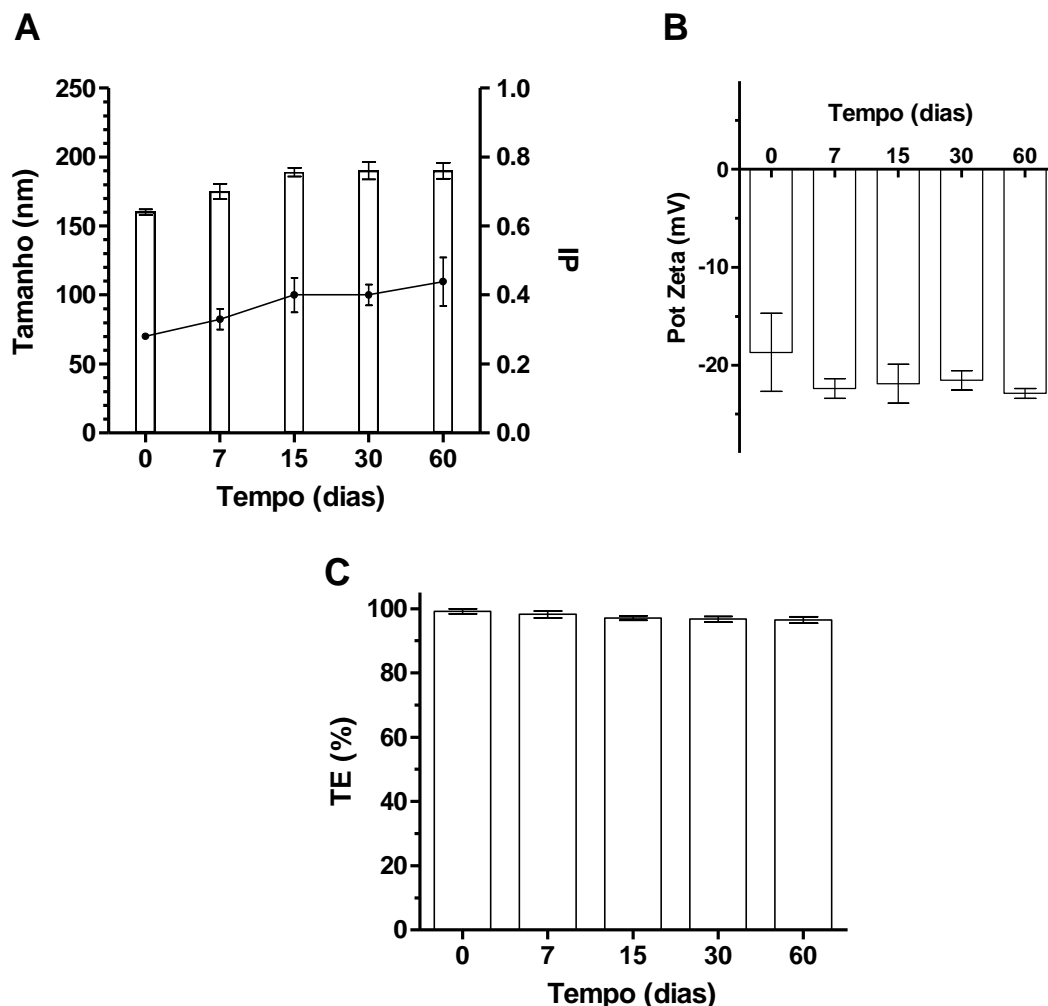


Comparando o espectro de FTIR de AR e NE-AR, foi verificado que as bandas em 1400 cm^{-1} , características de C=C, estão presentes apenas no espectro do AR, mas não no de NE-AR. Por outro lado, ao se comparar NE-BR e NE-AR, nota-se que não há alterações no perfil destes dois espectros. Estes dados, combinados com o observado na análise de TE e pelas imagens de microscopia de luz polarizada, sugerem que aconteceu total encapsulação do AR na NE.

3.3 Estudo preliminar de estabilidade

Após 15 dias de armazenamento na geladeira, a NE-AR-AH apresentou um aumento significativo no tamanho, de 160 ± 2 para 189 ± 3 nm e, a partir daí, manteve-se constante até 60 dias (Figura 24A). O potencial zeta negativo da NE-AR-AH também se manteve constante ao longo dos 60 dias (Figura 24B) e o AR permaneceu com um elevado TE ($96,5 \pm 1,0$ % após 60 dias; Figura 24C) na NE revestida com AH. Finalmente, não se observou visualmente a presença de cristais de cor amarela, característicos da presença de AR na fase aquosa externa de ambas NE, indicando a elevada encapsulação do AR ao longo do tempo. Analisados juntos, estes dados indicam a estabilidade da NE-AR revestida por AH após ser armazenada por até 60 dias em geladeira.

Figura 24 – Análise da estabilidade da NE-AR revestida por AH ao longo de 60 dias. (A) Diâmetro médio e índice de polidispersão. (B) Potencial zeta. (C) Teor de encapsulação.

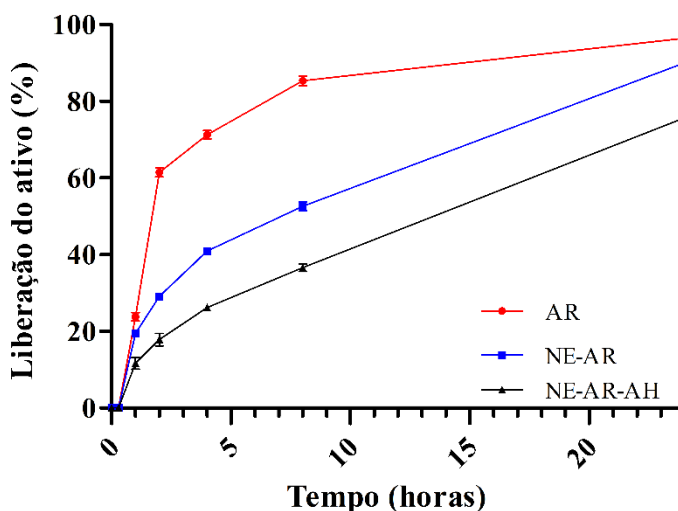


3.4 Estudo de liberação *in vitro*

Após todos os testes de caracterização da formulação, foi realizado um estudo de liberação para avaliar o perfil de liberação do fármaco das NE revestidas e sem revestimento. Os perfis de liberação do ativo liberado nas NE, revestidas e não revestidas, e a difusão da solução de AR são mostrados na figura 27. A partir dos dados experimentais, é possível verificar que no mesmo meio de dissolução, NE-AR-AH libera mais lentamente o AR do que NE-AR em 24 horas ($p < 0,05$). Isto pode ser associado ao revestimento hidrofílico externo, o que poderia dificultar a passagem do ativo através desta camada. Como esperado, a taxa de

difusão da solução de AR foi maior do que ambas as formulações ao longo de 24 horas. Após este tempo, $96,5 \pm 1,5$ % da solução de AR foi difundido, enquanto $90,1 \pm 1,1$ % do total de AR foi liberado da NE-AR e $75,7 \pm 1,4$ % de NE-AR-AH.

Figura 25 – Perfis de liberação do AR, NE-AR e NE-AR-AH ao longo do tempo.



A interpretação quantitativa dos valores obtidos no teste de liberação/dissolução é facilitada pelo uso de equações que matematicamente traduzem a curva de dissolução em função de alguns parâmetros relacionados com a forma farmacêutica. Na tabela 14 estão apresentados os coeficientes de determinação após aplicar os modelos matemáticos. Um dos critérios para se avaliar qual é o melhor modelo que descreve o perfil de liberação do fármaco é através do coeficiente de determinação (r^2), sendo que o modelo mais adequado é aquele que apresentou o maior coeficiente. Assim, para todos os sistemas avaliados, incluindo o AR livre, o modelo que melhor se aplica é o de cinética de primeira ordem, que apresentou os maiores coeficientes determinados (0,7958, 0,9905 e 0,9931, para o AR livre, NE-AR e NE-AR-AH, respectivamente). Isto significa que as formas farmacêuticas que seguem este perfil de liberação liberam uma quantidade de fármaco proporcional à quantidade restante no seu interior por unidade de tempo, de modo que a taxa de fármaco liberada no meio vai aumentando com o passar do tempo (MULYE, TURCO, 1995; COSTA & SOUSA LOBO, 2001). Além disso, verifica-se que o perfil de liberação do NE-AR-AH foi mais lento quando comparado com AR

e NE-AR, isso pode ser atribuído ao revestimento com AH que desempenha um papel de barreira, o que poderia restringir a dispersão do fármaco no meio de diálise (TRAN et al., 2014).

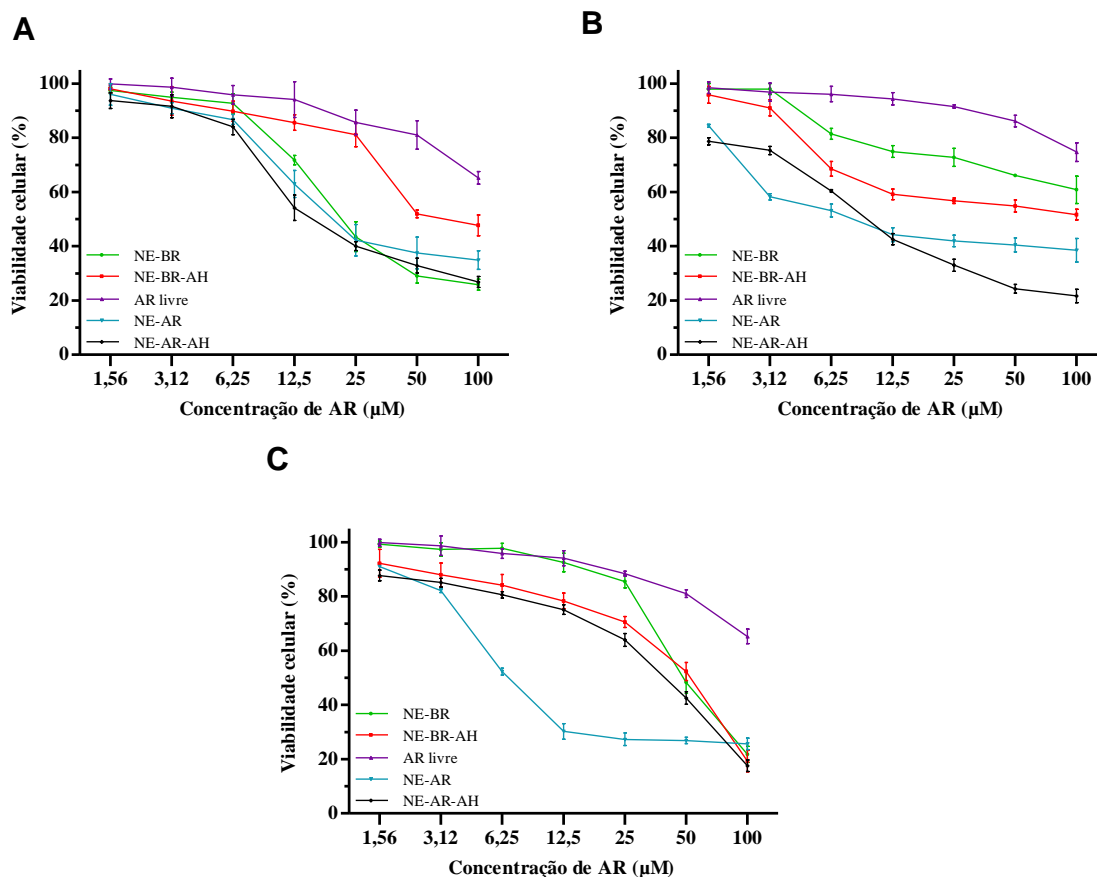
Tabela 14 – Coeficientes de determinação referentes à cinética de liberação/dissolução do AR em PBS:etanol:Tween[®] 80 (88:10:2) determinados após a aplicação dos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, modelo de Higuchi e Korsmeyer-Peppas.

Modelos matemáticos	AR livre	NE-AR	NE-AR-AH
Ordem zero	0,5505	0,8629	0,9447
Primeira ordem	0,7958	0,9905	0,9931
Higuchi	0,1599	0,9801	0,9859
Korsmeyer-Peppas	0,4999	0,7755	0,7692

3.4.2 Avaliação da viabilidade celular

Para investigar se a citotoxicidade do AR foi afetada pela incorporação em NE revestida por AH, o ensaio de viabilidade celular utilizando MTT foi realizado em células normais e cancerosas. Primeiramente, foi avaliada a viabilidade celular em células cancerosas (MCF-7 e MDA-MB-231) e normais (L929), que foram incubadas com AR livre, NE-AR, NE-AR-AH e suas respectivas formulações brancas. Os resultados das análises, expressos em porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle, estão apresentados na figura 28 e os respectivos IC50 calculados encontram-se na tabela 15.

Figura 26 – Estudos de viabilidade celular, avaliada por ensaio de MTT, em células MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) e L929 (C) após 48h de tratamento.



Dados expressos como média \pm SD de três experimentos independentes. As formulações brancas foram diluídas na mesma proporção que as carregadas com AR.

Tabela 15 – Valores de IC₅₀ calculados para as linhagens de células tumorais e normais*.

Linhagens celulares	AR livre	NE-AR	NE-AR-AH
L929	194 \pm 30	9,6 \pm 2,1	32,7 \pm 3,2
MDA-MB-231	454 \pm 9	13,5 \pm 3,9	11,6 \pm 0,2
MCF-7	188 \pm 50	29 \pm 6	22 \pm 1

*Dados representados por média \pm DP, n = 3.

Independente da linhagem celular avaliada, a atividade citotóxica observada para o AR livre (viabilidade celular de aproximadamente 80%) foi significativamente menor do que aquela observada para os demais tratamentos. Os dados para AR livre podem ser comparado com estudos descritos anteriormente (FANJUL *et al.*, 1996; HONG *et al.*, 2009).Em todas as

linhagens estudadas, houve uma resposta dose-dependente ao tratamento com AR livre, mais evidente em MCF-7 que em MDA-MB-231, diminuindo a partir de 100% a 1,56 μ M para $65,2 \pm 2,3\%$ (MCF-7), $74,7 \pm 3,4\%$ (MDA-MB-231) e $65,2 \pm 2,7$ (L929).

Nas células MCF-7, o revestimento claramente reduziu a citotoxicidade da formulação branca, o que fica muito mais evidente nas concentrações a partir de 12,5 μ M. Além disso, a atividade da NE-AR-AH mostrou-se dose-dependente em todas as concentrações testadas e com menor viabilidade celular quando comparado com NE-AR. Em 50 μ M, por exemplo, a viabilidade celular foi de $81,0 \pm 5,3\%$, $37,5 \pm 5,8\%$ e $32,9 \pm 2,7\%$, para o AR livre, a NE-AR e a NE-AR-AH, respectivamente. Da mesma forma, observa-se IC₅₀ calculado de $188 \pm 50\mu$ M, $29 \pm 6\mu$ M e $22 \pm 1\mu$ M para o AR livre, NE-AR e NE-AR-AH, respectivamente.

Para as células MDA-MB-231, foi observado que efeito citotóxico apresentado pelo AR livre foi inexpressivo em todas as concentrações avaliadas. Esta linhagem celular se mostrou bastante sensível mesmo às formulações brancas, mas a viabilidade celular se manteve acima de 50% até 50 μ M. A NE-AR-AH apresentou efeito citotóxico dose-dependente, com uma atividade maior que a NE-AR evidenciada nas concentrações maiores, acima de 12,5 μ M. Na concentração de 25 μ M, por exemplo, é possível observar claramente que a NE-AR-AH ($33,0 \pm 2,3\%$) apresenta atividade maior que a NE-AR ($42,0 \pm 2,1\%$) e muito maior que o AR livre ($91,6 \pm 0,6\%$). Isso condiz como os resultados de IC₅₀, sendo $454 \pm 9\mu$ M para o AR livre, $13,5 \pm 3,9\mu$ M para a NE-AR e $11,6 \pm 0,2\mu$ M para a NE-AR-AH, respectivamente.

O aumento da atividade citotóxica do AR promovido por sua encapsulação em sistemas lipídicos já foi previamente observado pelo nosso grupo (CARNEIRO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015). Entretanto, o caráter inédito do revestimento desses sistemas com AH traz a inovação desta atividade ser ainda mais pronunciada. Assim, não só as NE-AR favorecem a captação celular do fármaco, mas especialmente as NE-AR revestidas com AH, levando as células a ficarem mais susceptíveis à ação do AR com o aumento da sua concentração intracelular. Analisando-se o perfil de liberação do AR a partir das NE revestidas, espera-se que o nanossistema seja primeiramente captado pelas células para que, em seguida, o AR seja liberado já no meio intracelular. Esse efeito pode ser explicado pela natureza lipofílica do transportador e captação intracelular aumentada, por meio de um processo de endocitose mediada pelo receptor CD44 (RAMASAMY *et al.*, 2013; TRAN *et al.*, 2014b).

Além disso, foi observada maior toxicidade de NE-AR-AH em células MDA-MB-231 quando comparada com a linhagem MCF-7, o que está diretamente associada à expressão de receptor CD44. A linhagem de MCF-7 apresenta baixos níveis de expressão desse receptor

(TRAN *et al.*, 2014), o que faz com que a captação das NE revestidas por AH seja menor quando comparada com a MDA-MB-231, que apresenta maiores níveis de expressão de CD44.

No que diz respeito à linhagem de fibroblastos normais (L929), observa-se que há atividade citotóxica das formulações brancas, especialmente nas concentrações mais elevadas. Em concentrações até 25 μM , a viabilidade de ambas formulações é superior a 70 %. Claramente, a NE-AR apresentou maior citotoxicidade do que a NE-AR-AH em todas as concentrações testadas, exceto na maior concentração (100 μM), em que todas as formulações promoveram intensa redução na viabilidade celular. De fato, esta diferença também fica evidente nos IC50 calculados: NE-AR ($9,6 \pm 2,1 \mu\text{M}$) apresentou IC50 menor que o da NE-AR-AH ($32,7 \pm 3,2 \mu\text{M}$). A toxicidade de NLS ou lipossomas estabilizados por lípides catiônicos já foi previamente observada. A interação entre moléculas catiônicas anfifílicas com os fosfolípides aniônicos da membrana celular induz o aparecimento de danos na membrana e, com isso, uma citotoxicidade inespecífica (ROBERTS e ADDY, 1981; LAPPALAINEN *et al.*, 1994; SCHOLER *et al.*, 2001; CARNEIRO, *et al.*, 2012; FENG & ZHANG, 2013). Esta citotoxicidade inespecífica, aparentemente, pode ser reduzida com o revestimento com o AH aniônico, uma vez que se observou menor toxicidade com as formulações revestidas.

Estes dados, analisados juntos com os anteriores, evidenciam a importância do revestimento do produto final, a NE contendo o par iônico entre AR e SA, em uma tentativa de reduzir a toxicidade associada à carga positiva da SA e de aumentar a citotoxicidade do AR nas linhagens celulares de câncer de mama, especialmente nas sobreexpressoras de CD44.

4 CONCLUSÃO PARCIAL

Nesta etapa do trabalho foram desenvolvidas NE contendo AR, um ácido hidrofóbico e uma amina lipofílica SA. Dessa forma, ao incorporar o AR na formulação obteve-se um elevado TE (em torno de 100%), associado a formação de um par iônico entre o AR e SA. O revestimento da NE por AH a 0,5 mg/mL de AH apresentou tamanho reduzido, potencial zeta negativo associado ao revestimento e manteve o elevado TE. A formulação se revelou estável ao longo de 60 dias.

A liberação do AR a partir das NE revestida e sem revestimento apresentou cinética de primeira ordem, sendo que a NE revestida liberou o AR mais lentamente que a NE sem revestimento, como consequência da camada hidrofílica adicional de AH. Por fim, quando foi realizado os estudos de avaliação da atividade *in vitro* em células normais e tumorais verifica-se que a NE-AR-AH apresentou menor toxicidade as células normais e maior atividade anticâncer *in vitro* em células sobreexpressoras do receptor CD44.

Assim, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a NE contendo AR e revestida por AH é uma alternativa promissora para a administração intravenosa deste fármaco, com o intuito de ser utilizada no tratamento de cânceres que sobreexpressam o receptor CD44.

5 CONCLUSÃO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de NE contendo AR revestidas por AH. Na primeira parte, foi desenvolvido um método analítico por espectrofotometria no ultravioleta para o doseamento de AR em NE como uma alternativa à quantificação do AR por CLAE. O método proposto apresentou linearidade, seletividade, precisão e exatidão adequados para esta quantificação. No entanto, o método não foi robusto. Considerando que é um método rápido, barato e com a seletividade necessária, ele pode ser aplicado na determinação de AR encapsulado nos nanossistemas desenvolvidos.

Na segunda parte desse trabalho, foi desenvolvida e caracterizada uma NE contendo AR e revestida por AH. Esta formulação apresentou tamanho pequeno, distribuição monodispersa, potencial zeta negativo e elevado TE, compatíveis com a administração intravenosa. O produto também se revelou estável ao longo de 60 dias. Avaliando-se os resultados encontrados no estudo de atividade *in vitro*, verifica-se a importância do revestimento da NE contendo o par iônico entre AR e SA, pois toxicidade associada à carga positiva da SA foi reduzida, além de ter sido aumentada a atividade antitumoral do AR em linhagem celulares de câncer de mama.

Portanto, a NE contendo um par iônico entre AR e SA revestida por AH pode se tornar uma alternativa interessante para a administração intravenosa do AR no tratamento do câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULMAJED, K.; HEARD, C. M. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug. 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. **Int J Pharm**, v. 280, n. 1-2, p. 113-24, 2004.

ABDULMAJED, K.; HEARD, C. M. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug. 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. **Int J Pharm**, v. 280, n. 1-2, p. 113-24, 2004.

ABDULMAJED, K.; HEARD, C. M. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug. 1. Synthesis, penetration into and permeation across human skin. **Int J Pharm**, v. 280, n. 1-2, p. 113-24, 2004.

ADAMSON, P. C. et al. Variability in the oral bioavailability of all-trans-retinoic acid. *J Natl Cancer Inst*, v. 85, n. 12, p. 993-6, 1993.

AGALLOCO, J.; CARLETON, F. J. Validation of pharmaceutical processes. 3th ed. **New York: Informa Healthcare**, 2008.

AGALLOCO, J.; CARLETON, F. J. Validation of pharmaceutical processes. 3th ed. **New York: Informa Healthcare**, 2008.

ALIZADEH, F. et al. Retinoids and their biological effects against cancer. **Int Immunopharmacol**, v. 18, n. 1, p. 43-9, 2014.

ALMALIK, A. et al. Hyaluronic acid (HA) presentation as a tool to modulate and control the receptor-mediated uptake of HA-coated nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 21, p. 5369-80, 2013.

ALMALIK, A.; DAY, P. J.; TIRELLI, N. HA-coated chitosan nanoparticles for CD44-mediated nucleic acid delivery. **Macromol Biosci**, v. 13, n. 12, p. 1671-80, 2013.

ALMEIDA *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

BARBOSA, M. V. Desenvolvimento de lipossomas ph-sensíveis contendo paclitaxel: aspectos farmacotécnicos e avaliação da atividade citotóxica in vitro. 2014. 178f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Departamento de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais. 2014.

BERGOLD, A. M. et al. Interconversão Tretinoína/Isotretinoína: Um Problema no Preparo de Formulações Farmacêuticas. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 3, n. 22, p. 249-54, 2003.

BERGOLD, A. M. et al. Interconversão Tretinoína/Isotretinoína: Um Problema no Preparo de Formulações Farmacêuticas. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 3, n. 22, p. 249-54, 2003.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **Int J Pharm**, v. 280, n. 1-2, p. 241-51, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, de 2 junho de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, de 2 junho de 2003.

BRASILEIRO-FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular. In: Brasileiro-Filho, G. **Bogliolo Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 175-236.

BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BUSHUE, N.; WAN, Y. J. Retinoid pathway and cancer therapeutics. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n.13, p. 1285-98, 2010.

CARNEIRO, G. *et al.* Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and anticancer activity of all-trans retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, n. 7, p. 6011- 6020, 2012.

CASTRO, G. A. et al. Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne. *J Microencapsul*, v. 24, n. 5, p. 395-407, 2007.

CASTRO, G. A. et al. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm*, v. 381, n.1, p. 77-83, 2009.

CASTRO, G. A.; FERREIRA, L. A. Novel vesicular and particulate drug delivery systems for topical treatment of acne. *Expert Opin Drug Deliv*, v. 5, n. 6, p. 665-79, 2008.

CHABNER, B. A.; ROBERTS JR, T. G. Chemotherapy and the war on câncer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 65-72, 2005.

CHANSRI, N. et al. Inhibition of liver metastasis by all-trans retinoic acid incorporated into O/W emulsions in mice. *Int J Pharm*, v. 321, n. 1-2, p. 42-9, 2006.

CHIANG, P. C. *et al.* Nanosuspension delivery of paclitaxel to xenograft mice can alter drug disposition and anti-tumor activity. **Nanoscale Research Letters**, v.9, n.156, p. 1-10, 2014.

CHOI, K. Y. et al. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: Interfacial interactions with proteins in cancer. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 99, p. 82-94, 2012.

DAS, B. C. et al. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. **Bioorg Med Chem**, v. 22, n. 2, p. 673-83, 2014.

DHAKAD, R.S.; TEKADE, R. K.; JAIN, N.K. Cancer targeting potential of folate targeted nanocarrier under comparative influence of tretinoin and dexamethasone. **Curr Drug Deliv.**, v.10, n.4, p. 477-491, 2013.

ELNAKAT, H.; RATNAM, M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.56, p.1067– 1084, 2004.

GOTTE, M.; AND YIP, G.W. Heparanase, Hyaluronan, and CD44 in Cancers: A Breast Carcinoma Perspective. **Cancer Research** v. 66, n. 21, 2006; November 1, 2006.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Washington. V. 68, p. 305A-309A, 1996.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Washington. V. 68, p. 305A-309A, 1996.

HAMILTON, S.R. et al. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) Form Complexes with ERK1, 2 That sustain high basal motility in breast cancer cells. **The Journal of Biological chemistry**, v.262, n.22, p.16667-80, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HONG, G. Y. *et al.* Combination of Paclitaxel- and Retinoic Acid-incorporated Nanoparticles for the Treatment of CT-26 Colon Carcinoma. **Arch Pharm Res**, v. 34, n. 3, p. 407-417, 2011.

HOU, L. *et al.* Pharmacokinetics of a paclitaxel-loaded low molecular weight heparin-all-transretinoid acid conjugate ternary nanoparticulate drug delivery system. **Biomaterials**, v. 33, p. 5431-5440, 2012.

HU, L.; TANG, X. C., F. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 12, p. 1527-1535, 2004.

HU, L.; TANG, X.; CUI, F. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. **J Pharm Pharmacol**, v. 56, n. 12, p. 1527-35, 2004.

HYUNG, W. et al. Novel hyaluronic acid (HA) coated drug carriers (HCDCs) for human breast cancer treatment. **Biotechnol Bioeng**, v. 99, n. 2, p. 442-54, 2008.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 15/12/2015.

INTERNATIONAL, Conference on Harmonization – ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. Geneva: ICH Secretariat, 2005. 17p.

INTERNATIONAL, Conference on Harmonization – ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. Geneva: ICH Secretariat, 2005. 17p.

JENNING, V.; GOHLA, S. H. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J*

KARMAKAR, S. *et al.* Combination of All-Trans Retinoic Acid and Paclitaxel-Induced differentiation and apoptosis in human glioblastoma u87mg xenografts in nude mice. **Cancer**, v. 112, n. 3, p. 596-607, 2008.

KATIYAR, B. S. *et al.* Microemulsions: A Novel Drug Carrier System. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 20, n. 2, p. 138-48, 2013.

KAWAKAMI, S. *et al.* Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by all-trans retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes. **J Control Release**, v. 110, n. 3, p. 514-21, 2006.

KELMANN, R. G. *et al.* Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **Int J Pharm**, v. 342, n. 1-2, p. 231-9, 2007.

KENNY, L. M.; ABOAGYE, E. O.; PRICE, P. M. Positron emission tomography imaging of cell proliferation in oncology. **Clinical Oncology**, v. 16, p. 176-185, 2004.

KENTISH, S.; Wooster, T. J.; Ashokkumar, M.; Balachandran, S.; Mawson, R.; Simons, L.; The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 9, p. 170 -175.

KLANG, S.; BENITA, S. Em Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration; Benita, S., ed.; **Overseas Publishers Association: Amsterdam**, 1998.

KLINGBEIL, P.; NATRAJAN, R.; EVERITT, G.; VATCHEVA, R.; MARCHIO, C.; PALACIOS, J.; BUERGER, H.; REIS-FILHO, J.S.; ISACKE, C.M. CD44 is over expressed in basal-like breast cancers but is not a driver of 11p13 amplification. **Breast Cancer Research and Treatment**. P.95-109, 2009.

LIM, S. J.; KIM, C. K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int J Pharm*, v. 243, n. 1-2, p. 135-46, 2002.

- LIM, S. J.; LEE, M. K.; KIM, C. K. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. *J Control Release*, v. 100, n. 1, p. 53-61, 2004.
- MARTINI, E. et al. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 930-4, 2007.
- MEYER, K.; PALMER, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol Chem.* p. 629-634, 1934.
- MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n.1, p. 561-573, 2006.
- MOONEY, D. Cancer: one step at a time. *Nature*, v. 436, n. 7050, p. 468-9, 2005.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65(1-2), p. 55-63, 1983.
- MUELLER, R. H. *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 50, p. 161-177, 2000.
- MUINDI, J. *et al.* Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations: implications for relapse and retinoid "resistance" in patients with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 79, n. 2, p. 299-303, 1992.
- NAOR, D.; SIONOV, R.V.; ISH-SHALOM, D. CD44: structure, function, and association with the malignant process **Advances in Cancer Research**. v. 71, p. 241-319, 1997.
- NILES, R. M. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. **Mutat Res**, v.555, n. 1-2, p. 81-96, 2004.
- ORTIZ, M. A. *et al.* Retinoids in combination therapies for the treatment of cancer: mechanisms and perspectives. **Drug Resist Updat**, v. 5, n. 3-4, p. 162-75, 2002.

PAN, X. Q. et al. Strategy for the treatment of acute myelogenous leukemia based on folate receptor beta-targeted liposomal doxorubicin combined with receptor induction using all-trans retinoic acid. **Blood**, v. 100, n. 2, p. 594-602, 2002.

PANCHAGNULA, R. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 172, p. 1-15, 1998.

PONNURAJ K., JEDRZEJAS, M.J. Mechanism of Hyaluronan Binding and Degradation: Structure of Streptococcus pneumoniae Hyaluronate Lyase in Complex with Hyaluronic Acid Disaccharide at 1.7 Å Resolution. **J Mol Biol.** V. 4, n. 299, p.885-895, 2000.

PRAKASH, S. et al. Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 14-15, p. 1340-51, 2011.

QI, H.; RATNAM, M. Synergistic induction of folate receptor b by all-trans retinoic acid and histone deacetylase inhibitors in acute myelogenous leukemia cells: mechanism and utility in enhancing selective growth inhibition by antifolates. **Cancer Res**, v. 66, p. 5875-5882, 2006.

QUINTANA, A. et al. Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. **Pharm. Res.**, v. 19, n. 9, p. 1310-6, 2002.

RIVKIN, I.; COHEN, K.; KOFFLER, J.; MELIKHOV, D.; PEER, D.; MARGALIT, R. Paclitaxel-clusters coated with hyaluronan as selective tumor-targeted nanovectors. **Biomaterials**, v. 31, p. 7106-7114, 2010.

ROBBINS, K.; COTRAN. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

ROBBINS; COTRAN. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7ª edição. Elsevier, 2006.

ROBERTS, W. R.; ADDY, M. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. **Relevance to mode of action. J Clin Periodontol**, v. 8, n. 4, p. 295-310, 1981.

SANTOS-MAGALHAES, N. S. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **Int J Pharm**, v. 208, n. 1-2, p. 71-80, 2000.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 24-32, 2010.

SHERIDAN, C.; KISHIMOTO, H.; FUCHS, R. K.; MEHROTRA, S.; BHAT-NAKSHATRI, P.; TURNER, C.H.; GOULET, JR R.; BADVE, S.; NAKSHATRI, H. CD44/CD24 breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. **Breast Cancer Research**, v.8, n.5, p, R59. 2006.

SHIOKAWA, T. *et al.* Effect of polyethylene glycol linker chain length of folate-linked microemulsions loading aclacinomycin A on targeting ability and antitumor effect in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res.**, v. 5, n. 11, p. 2018-2025, 2005.

SILVA, E. L. *et al.* Improved *in vitro* antileukemic activity af all-trans retinoic acid loaded in cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles. **Journal of nanscience and nanotechnology**, v. 16, p. 1291-1300, 2016

SILVA, E. L. *et al.* Nanostructured lipid carriers loaded with tributyrin as an alternative to improve anticancer activity of all-trans retinoic acid. **Expert Rev. Anticancer Ther**, v.2, n. 15, p. 247–256, 2015.

SILVA, F. L. O. *et al.* Determination of all-trans retinoic acid loaded in solid lipid nanaparticles by differential pulse voltammetry at glassy carbono electrode. **Electrochimica Acta**. v. 182, p. 929-934, 2015.

SINGLA, A. K.; GARG, A.; AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 235, p. 179–192, 2002.

SOUZA, M. A. C. Estudo comparativo de duas formas farmacêuticas de cloridrato de diltiazem. Aplicação de método analítico desenvolvido e validado visando o controle de qualidade, 2014. 141f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2014.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p.25-35, 2005.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p.25-35, 2005.

STINCHCOMBE TE. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel: a novel cremophor-EL-free formulation of paclitaxel. **Nanomedicine (Lond)**, v. 2, n. 4, p. 415-423, 2007.

SUN, S. Y.; LOTAN, R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 41, n. 1, p. 41-55, 2002.

SURRAPPANENI, M. S. *et al.* Designing paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. **International Scholarly Research Network Pharmacology**, p. 1-15, 2012.

TANG, X. H.; GUDAS, L. J. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 345-64, 2011.

TEKADE, R. K. *et al.* Surface-engineered dendrimers for dual drug delivery: A receptor up-regulation and enhanced cancer targeting strategy. **Journal of Drug Targeting, December**, v. 16, n.10, p. 758–772, 2008.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**., v. 74, p. 835-855, 2002.

TOOLE, B. P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. **Nature Reviews Cancer**, v.4, n.7, p. 528-539, 2004.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 3, p. 131-5, 2011.

TRAN, T. H. *et al.* Hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles for targeted delivery of vorinostat to CD44 overexpressing cancer cells. **Carbohydr Polym**, v. 114, p. 407-15, 2014.

TRÉDAN, O. *et al.* Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **J Natl Cancer Inst**, v.99, p. 1441–1454, 2007.

VANDAMME, T. F.; ANTON, N. Low-energy nanoemulsification to design veterinary controlled drug delivery devices. **Int J Nanomedicine**, v. 5, p. 867-73, 2010.

WANG, H. *et al.* Differentiation-independent retinoid induction of folate receptor type β , a potential tumor target in myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, p. 3529-36, 2000.

WISSING, A. S. *et al.* Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1257– 1272, 2004.

YANG, Q. *et al.* Retinoid, retinoic acid receptor beta and breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 76, n. 2, p. 167-73, 2002.

YOSHIZAWA, Y. *et al.* A novel approach to overcome multidrug resistance: Utilization of P-gp mediated efflux of paclitaxel to attack neighboring vascular endothelial cells in tumors, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1-29, 2014.